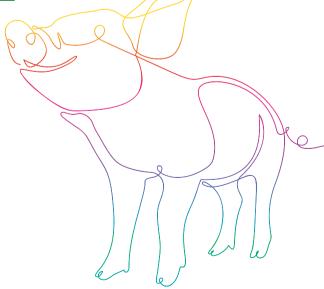
ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI



MEETING ANNUALE

Pescantina (VR) 30/31 Marzo 2023

Villa Quaranta



ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2023

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.
Pubblicato da SIPAS.
ISBN 978-88-903311-0-7

INDICE

Prefazione	p. 18
ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO	
SALMONELLOSI NEL SUINO: UN PROBLEMA DA AFFRONTARE	
Parma, 14 Ottobre 2022	
SALMONELLOSI NEL SUINO: TRA SANITÀ ANIMALE E SANITÀ PUBBLICA Lisa Barco	p. 20
SALMONELLOSI NEL SUINO IN GERMANIA/DANIMARCA: IL RUOLO DELL'AUTORITÀ COMPETENTE E DEL VETERINARIO AZIENDALE NEL-LA GESTIONE DEL FOCOLAIO Hendrik Nienhoff	
SALMONELLA: PASSATO, PRESENTE E POSSIBILE FUTURO IN SPAGNA Javier Roques Mata	p. 24
IL VALORE AGGIUNTO DELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO NELLA GESTIONE DI UN FOCOLAIO DI SALMONELLOSI NEL SUINO Magistrali Chiara Francesca	
ATTI DEL XLVIII MEETING ANNUALE	
Pescantina (VR), 30-31 Marzo 2023	
ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP: NUOVI STRUMENTI A SUPPORTO DEL MEDICO VETERINARIO PER UTILIZZO CONSAPEVOLE Salvatore Catania	
ANTIBIOTICORESISTENZA DEI PATOGENI BATTERICI DEL SUINO E POSSIBILITÀ TERAPEUTICHE: LA SITUAZIONE ATTUALE Patrizia Bassi	p. 39
IMPATTO DELLA BIOSICUREZZA SULLA SALUTE DEL SUINO E SULLA RIDUZIONE DEI TRATTAMENTI ANTIBIOTICI NELLA PRODUZIONE SUINICOLA Elise Bernaerdt	p. 52
EPIDEMIOLOGIA ED EVOLUZIONE DI PCV-2: UN VECCHIO, NUOVO VIRUS Giavanni Franzo	p. 60

NELLA BATTAGLIA EVOLUTIVA DEL CIRCOVIRUS SUINO DI TIPO 2 NEI MAIALI Hans Nauwynck	p.
ASPETTI PRATICI NELLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE ASSOCIATE A PCV2 Francisco J. Pallarés	p.
COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE	
PESTE SUINA AFRICANA IN ITALIA: GESTIONE DELL'ALLERTA E DELLE EMERGENZE	
Iscaro C., Ruocco L., Di Sabatino D., Sordilli M., Pacelli F., Rolesu S., Chiavacci L., Scaramozzino P., Feliziani F.	p
DISINFETTANTI VS PSA: STATO DELL'ARTE TRA CONOSCENZE E LACUNE Beato M.S., D'Errico F., Feliziani F.	p
TRASPORTO DEL SUINO: TRA BENESSERE, ASPETTI ECONOMICI E DI QUALITÀ DELLA COSCIA	
Scollo A., Contiero B., Benatti D., Gottardo F.	p.
PREVALENZA E GRAVITÀ DI LESIONE ALLA CODA E FREQUENZA DI ASCESSI E DIFETTI NELLE CARCASSE DI SUINI SOTTOPOSTI O NO A CAUDOTOMIA	
Trevisi P., Luise D., Virdis S., Dalcanale S., Rolla U	p.
IMPORTANZA DEL MONITORAGGIO NEL TEMPO DELL'ANTIBIOTICO- SENSIBILITÀ DEI PRINCIPALI PATOGENI DEL SUINO: 20 ANNI DI ESPE- RIENZA IN FILIERA.	
Sandri G., Giovanardi D., Ortali G., Dalla Bona M.	p.
DIFFUSIONE DI CLONI DI <i>STREPTOCOCCUS SUIS</i> SIEROTIPO 9 CARATTE- RIZZATI DA UNA RIDOTTA SENSIBILITÀ AI BETA LATTAMICI IN ITALIA Cucco L., Massacci F.R., Paniccià M., Luppi A., Albini E., Ferroni L., Ustulin M.,	
Peruzzo A., Orsini M., Magistrali C.F.	p.
UN BLEND DI TIMOLO ED ACIDI ORGANICI PUÒ SUPPORTARE L'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ANTIBIOTICI CONVENZIONALI CONTRO <i>STREP-TOCOCCUS SUIS</i>	
Giovagnoni G., Tugnoli B., Piva A., Grilli E.	p.
ARTRITE DA <i>MYCOPLASMA HYORHINIS</i> E <i>MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE</i> IN SUINI CON SEGNI CLINICI DI ZOPPIA – INDAGINI PRELIMINARI <i>Merenda M., Cornaggia M., Tondo A., Foiani G., Bottinelli M., Tonelli C., Mondin P.,</i>	
Vio D., Catania S.	p.

FORTE IMPATTO DEL BACKGROUND GENETICO DI VIRUS E OSPITE

VALUTAZIONE DELLA CONDIZIONE DI ANEMIA DEI SUINETTI AL MOMENTO DELLO SVEZZAMENTO Bini G , $Mazzoni$ C , $Scollo$ A	p. 140
RUOLO DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) E DEL VIRUS DELLA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA DEL SUINO (PRRSV) NEL CONTESTO DEL COMPLESSO DELLE MALATTIE RESPIRATORIE DEL SUINO (PRDC) IN ITALIA D'annunzio G., Ostanello F., Muscatello L.V., Orioles M., Jacumin N., Tommasini N.,	149
	p. 148
CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2: MALATTIA SISTEMICA IN SUINI VACCINATI PER PCV2	
Torreggiani C., Pellacini M., D'annunzio G., Bassi P., Gabbi V., Manfredi R., Prosperi A., Chiapponi C., Luppi A.	p. 163
UTILIZZO DELL'ANALISI FILOGENETICA DEL GENE ORF5 PER IL MONITO-RAGGIO DI FILIERA DI CEPPI DI PRRSV-1	
Ustulin M., Targhetta C., Ferino L., Zanon C., Rolla U., Vio D.	p. 171
GRAVE SINTOMATOLOGIA NEUROLOGICA CON ELEVATA MORTALITÀ IN SUINI NEONATI Mazzoni C., Scollo A., Ubezio A., D'Annunzio G., Luppi A	p. 177
••	P. 177
SINTOMI NEUROLOGICI IN SUINI POST-SVEZZAMENTO De Lorenzi G., Bariselli S., Gherpelli Y., Pupillo G., Borri E., Franchi L., D'Annunzio G., Luppi A	p. 184
POSTER	
ANTIMICROBICO-SENSIBILITÀ DI CEPPI DI <i>GLAESSERELLA PARASUIS</i> ISO-LATI DA SUINI COMMERCIALI DAL 2017 AL 2022 Cordioli B., Rizzardi A., Guolo A., Palazzolo L. Garbuio M., Drigo I., Viel L., Bano L.	p. 190
PRIMA IDENTIFICAZIONE DEI GENI DI RESISTENZA AGLI OXAZOLIDINO- NI POXTA2 E CFR(D) IN UN ISOLATO DI STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE SUBSP. EQUISIMILIS DI ORIGINE SUINA Massacci F.R., Coccitto N.S., Cinthi M., Albini E., Cucco L., Orsini M., Giovanetti E., Brenciani A., Magistrali C.F.	p. 195
	r. 175
EFFETTI DELLA SOSTITUZIONE DELL'OSSIDO DI ZINCO CON UNA COMBINAZIONE DI ADDITIVI ALGALI (β-1,3-GLUCANO, BACILLUS SP. PB6 E ACIDO FORMICO) SULLE PRESTAZIONI DEI SUINI SVEZZATI	
Hands R., Sargeant E., Van Veggel N., Amory J., Neto R., Chikunya S.	p. 204

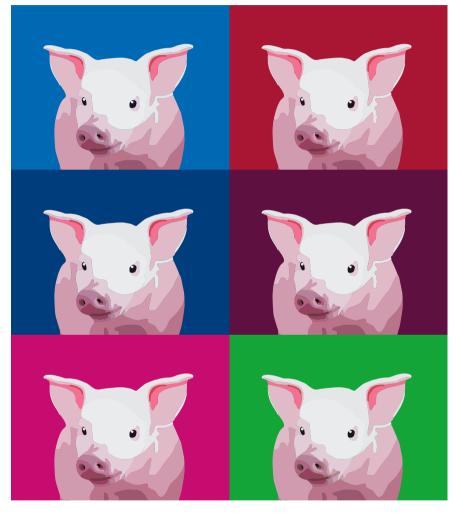
VALUTAZIONE DEL RUOLO DI BERGEYELLA ZOOHELCUM NEL COM- PLESSO DELLA MALATTIA RESPIRATORIA DEL SUINO Pupillo G., Bariselli S., Torri D., Gherpelli Y., De Lorenzi G., Dottori M	p. 206
CONGIUNTIVITE NEL SUINO SOSTENUTA DA <i>MYCOPLASMA</i> SP. 1654_15. CANDIDATA NUOVA SPECIE STRETTAMENTE CORRELATA A <i>MYCOPLASMA HYORHINIS</i>	
Cornaggia M., Merenda M., Vio D., Gastaldelli M., Conci V., Gagliazzo L., Bottinelli M., Sandri G., Catania S.	p. 213
EFFICIENZA DELLA LATTAZIONE E SALUTE DEL SUINETTO POST-SVEZZAMENTO TRAMITE SUPPLEMENTO DI CELLULE INTEGRE DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE INATTIVATE E STABILIZZATE NELLA DIETA DELLA SCROFA IN GESTAZIONE Borello I., Ghilardi M., Scollo A.	
INIBIZIONE DELLA REPLICAZIONE DEL VIRUS DELLA PESTE SUINA AFRICANA DA PARTE DEL β -GLUCANO	1
Ha Thi Thanh Tran, Anh Duc Truong, Nhu Thi Chu, Hoai Nam Vu, Huyen Thi Nguyen, Tinh Nguyen, Fatimah Siti, Hans Lee, Alexander De Leon, Andrew G.	p. 228
PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2023	
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2023 VINCITORE LA DISINFEZIONE COME STRUMENTO DI BIOSICUREZZA NELL'ALLEVA- MENTO SUINO: INDAGINE DEI BATTERI PATOGENI AMBIENTALI E DELLA RELATIVA ANTIBIOTICORESISTENZA	
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2023 VINCITORE LA DISINFEZIONE COME STRUMENTO DI BIOSICUREZZA NELL'ALLEVA- MENTO SUINO: INDAGINE DEI BATTERI PATOGENI AMBIENTALI E DELLA	
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2023 VINCITORE LA DISINFEZIONE COME STRUMENTO DI BIOSICUREZZA NELL'ALLEVA- MENTO SUINO: INDAGINE DEI BATTERI PATOGENI AMBIENTALI E DELLA RELATIVA ANTIBIOTICORESISTENZA Perrucci A. PREMIO	
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2023 VINCITORE LA DISINFEZIONE COME STRUMENTO DI BIOSICUREZZA NELL'ALLEVA- MENTO SUINO: INDAGINE DEI BATTERI PATOGENI AMBIENTALI E DELLA RELATIVA ANTIBIOTICORESISTENZA Perrucci A.	
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2023 VINCITORE LA DISINFEZIONE COME STRUMENTO DI BIOSICUREZZA NELL'ALLEVA- MENTO SUINO: INDAGINE DEI BATTERI PATOGENI AMBIENTALI E DELLA RELATIVA ANTIBIOTICORESISTENZA Perrucci A. PREMIO CASIMIRO TAROCCO 2023	

PREMIO FORMAZIONE PROFESSIONALE ITALIA 2022

DESCRIZIONE DI UN CASO DI ECHINOCOCCOSI SU SCROFE MACELLATE

Gaffuri M., Salvini F.	p. 256
PREMIO	
FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2022	
APPLICAZIONE DI IR BIOTYPER CON SPETTROSCOPIA A INFRAROSSI A	
TRASFORMATA DI FOURIER (FTIR) PER LA TIPIZZAZIONE DI ACTINOBA-	
CILLUS PLEUROPNEUMONIAE	
Moroni B., Musolino N., Cordovana M., Mauder N., Marra C., Alborali G.L., Pitti M.,	
Decastelli L., Dondo A., Zoppi S.	p. 262

The art of FLEX



LA FLESSIBILITÀ PER TRASFORMARE LA VACCINAZIONE IN ARTE









Insieme, oltre la salute animale







PER UNA PRONTA GUARIGIONE

SPEGNIla **FEBBRE**ed il **DOLORE**!



Per maggiori informazioni sugli ANTINFIAMMATORI CHEMIFARMA contattaci:

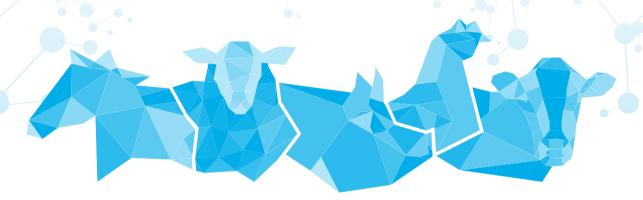


Tel. +39 0113157437

info.it@dechra.com







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



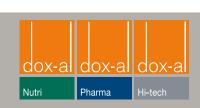
Sinergie per un perfetto equilibrio

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..









Proteggere i tuoi animali protegge il tuo business.

I prodotti, i servizi e l'esperienza di Elanco possono aiutarti a migliorare e consolidare il tuo successo nella suinicoltura, un mercato in continua evoluzione.







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

PREFAZIONE

Cari Soci,

è con estremo piacere che vi do il benvenuto, a nome di tutto il Consiglio Direttivo, al 48° Meeting annuale di SIPAS. Sono stata chiamata dall'attuale Presidente Andrea Luppi, a scrivere questa Prefazione e non vi nascondo, che considerando la portata dei miei predecessori, un po' di ansia da prestazione mi sia venuta. Dopo poco meno di sei anni di esperienza nel settore, far parte di una società come SIPAS, mi rende oltre che orgogliosa, lusingata; sono sicura che avrò modo di imparare moltissimo, sia dal punto di vista umano che professionale, sperando al contempo di apportare un mio valido contributo. Mi piace pensare di poter rappresentare i giovani veterinari, che si affacciano al settore suinicolo, con i dubbi e le paure che derivano dai primi passi; allo stesso tempo spero di poter parlare alle tantissime donne veterinarie, che negli anni hanno preso sempre più spazio, in un settore che decenni fa si trovava impreparato alla figura femminile, ma che pian piano è riuscito "ad aprire la mente" e dimostrare rispetto; in fondo quello che importa a chiunque è la professionalità, non di certo il genere a cui si appartiene. Sempre rivolgendosi ai giovani veterinari, SIPAS anche quest'anno ha previsto l'assegnazione di premi, sia legati a lavori di tesi, sia alla sovvenzione di borse di studio, da spendere a livello nazionale ed internazionale. Come membro di SIPAS trovo sia fondamentale continuare su questa strada, con candidature sempre più numerose, tali da apportare valore e innovazione al nostro settore.

La suinicoltura, italiana ed europea, continua ad essere protagonista di grandi sfide e cambiamenti. Da un punto di vista economico, il 2022 è stato un anno veramente difficile, con un'impennata del costo delle materie prime, legate alla guerra in corso, ma anche a grandi meccanismi speculativi e un prezzo kg/carne troppo basso per mantenere un'azienda produttiva. Si ha sempre timore a dirlo, ma il 2023 sembra possa essere un anno diverso, con esperti che prevedono un calo delle materie prime, sia cerealicole che proteiche, con un prezzo del suino che si sta mantenendo elevato e che sta permettendo agli allevatori di avere un pò di sollievo. Dal punto di vista sanitario, le sfide non sono da meno: a giugno 2022 abbiamo salutato definitivamente l'ossido di zinco e la strada verso una riduzione importante dell'uso dell'antibiotico, in Italia, è solo al suo esordio. Il lato normativo ci porta a luglio 2023, momento in cui verrà applicato il nuovo decreto biosicurezza, volto alla prevenzione della diffusione della PSA, che continua a rappresentare una grande minaccia per il nostro settore; guardando un po' più in là, ma nemmeno troppo, le richieste per il miglioramento del benessere animale, imporrano un impegno maggiore nell'allevare animali a coda integra, fino ad arrivare alla stabulazione libera per l'intero ciclo produttivo delle scrofe. Insomma, i cambiamenti in gioco sono veramente molti e stanno rivoluzionando il sistema di allevamento intensivo, ponendo la figura di noi veterinari al centro. Siamo chiamati a fare un importantissimo lavoro quotidiano, spesso estenuante e legato a risultati non soddisfacenti. Per fronteggiare tutto questo, avremo sempre più bisogno di raggiungere un livello di professionalità, conoscenze tecniche e collaborazione tra tutte le figure coinvolte nella filiera, sempre maggiore. Come disse durante una sua lezione il Prof. Vittorio Sala: "in questo corso non sentirete parlare né di clinica, né di terapia, perché se arrivassimo a parlare di questo, significa che abbiamo fallito nel nostro compito"; il lavoro del suiatra deve essere basato sull'analisi del rischio e sulla prevenzione, pur sapendo quanto sia difficile e quanti sforzi, anche economici, comporti. Nello scenario descritto è fondamentale il ruolo che SIPAS ha e dovrà avere nei prossimi anni, come punto di riferimento per tutti, mantenendosi sempre in contatto con le necessità del settore e fornendo gli strumenti necessari per affrontare il cambiamento.

Proprio in termini di cambiamento, SIPAS non voleva essere da meno e da quest'anno si è deciso di modificare un'antica tradizione: abbiamo pensato di rinnovarci, di essere eco-friendly e di eliminare il volume degli atti in forma cartacea, fornendovi solo la versione digitale. Questa scelta si è concretizzata in concomitanza ad un miglioramento del nostro sito, sul quale sarà possibile effettuare ricerche dei lavori scientifici per parola chiave, rendendo altamente fruibili tutti gli atti raccolti dal 2008 ad oggi. Per concludere, un ringraziamento sincero va a tutti i Soci, alla Segreteria Delegata per la grande professionalità e disponibilità e alle aziende Sponsor, per il prezioso contributo nel sostegno di SIPAS. Ognuno di voi permette il prosieguo di questo importante progetto.

Gloria Fortunato

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

SALMONELLOSI NEL SUINO: UN PROBLEMA DA AFFRONTARE

Parma, 14 Ottobre 2022

SALMONELLOSI NEL SUINO: TRA SANITÀ ANIMALE E SANITÀ PUBBLICA

LISA BARCO

Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi, IZS Venezie, Legnaro, Padova

L'intervento è stato volto a dettagliare la rilevanza della salmonellosi come zoonosi a trasmissione alimentare in ambito europeo e nazionale, focalizzandosi sul ruolo rivestito della filiera suina in questo specifico contesto.

La salmonellosi rimane la seconda zoonosi dopo il Campylobacter notificata in Europa e la prima in termini di numero di focolaio di malattia a trasmissione alimentare, nonché di casi umani ad essi correlati.

L'andamento nel tempo dei casi umani risulta piuttosto stabile, senza contare gli ultimi due anni (2020-2021), per cui le misure messe in atto per contrastare la pandemia da COVID 19 hanno determinato un'importante riduzione dei casi di molteplici zoonosi per lo più a trasmissione alimentare. Si tratta tuttavia di una riduzione

Confrontando i principali sierotipi responsabili di infezione nell'uomo si nota come la situazione europea non sia sovrapponibile a quella nazionale, dal momento che in EU *S*. Enteritidis rappresenta il primo sierotipo che conta per quasi il 60% dei casi umani, seguito a percentuali notevolmente più basse da *S*. Typhimurium e la sua variante monofasica (rispettivamente circa il 10% e il 5%). In Italia invece al primo posto si ritrova la variante monofasica di *S*. Typhimurium, mentre al secondo e terzo posto alternativamente nei diversi anni compaiono *S*. Typhimurium e *S*. Enteritidis.

Il centro di referenza nazionale per le salmonellosi ha condotto uno studio di 'source attribution' utilizzando un modello baiesiano, sviluppato da EFSA e denominato SAM, a partire dai dati relativi ai sierotipi di *Salmonella* notificati in Italia nel contesto dei piani nazionali di controllo (2018-2020) per galline ovaiole, broiler, tacchini da ingrasso, nonché i dati relativi ai controlli di igiene di processo sulle carcasse al macello campionati in regime di controllo ufficiale. La distribuzione dei sierotipi relativi a tali fonti sono stati confrontati con la distribuzione dei casi umani relativi allo stesso periodo come notificati al sistema TESSy.

Tale modello ha permesso di stimare che nell'intero periodo considerato alla fonte 'suina' sono state attribuite le percentuali più elevate di casi umani (variabili tra 22.57% del 2018 e il 34,27% del 2020). A seguire, la seconda fonte in termini di percentuale di casi umani è risultato il 'pollo da carne' (variabile tra 13.9% del 2020 e 17.33% del 2018), quindi la 'gallina ovaiola' (6.32% nel 2020 e 10.72% nel 2018) e il 'tacchino da carne' (1.71% nel 2020 e 5.16% nel 2019). In termini di rischio relativo il modello ha permesso di stimare che per il consumatore il rischio di acquisire *Salmonella* consumando carne suina è 3.5 volte superiore rispetto al consumo della stessa quantità di uova e doppio rispetto al consumo di carne di pollo.

Le evidenze raccolte sono in linea con altri lavori similari condotti in precedenza a partire da dati di sorveglianza nazionale, che hanno rimarcato la rilevanza della filiera suina nell'ambito dei casi umani di salmonellosi.

La seconda parte della presentazione ha riguardato la descrizione degli approcci seguiti in diversi contesti europei per lo sviluppo di piani di controllo di Salmonella nel suino. In particolare, sono stati sviluppati controlli volti all'eradicazione del patogeno, che hanno interessato i paesi del nord Europa in cui la prevalenza di *Salmonella* risultava estremamente bassa. L'investimento in questi contesti è stato molto elevato e ha interessato

l'intera filiera, portando paesi come Norvegia, Svezia e Finlandia ed avere riconosciute delle garanzie speciali per l'importazione di carni fresche. Molto più frequenti invece sono i piani di controllo sviluppati allo scopo di ottenere la riduzione della prevalenza di *Salmonella*. Questi si basano per lo più su approccio sierologico, con eventuale approfondimento microbiologico, al fine di categorizzare gli allevamento in funzione del rischio di *Salmonella* e gestire conseguentemente le macellazioni in funzione della categoria dell'allevamento di provenienza degli animali. Per quanto riguarda tali piani sono descritti casi di successo che hanno portato alla progressiva riduzione di *Salmonella*, ma in altri contesti le analisi costo-beneficio condotte hanno permesso di appurare che i costi sostenuti non giustificavano gli effettivi benefici ottenuti.

SALMONELLOSI NEL SUINO IN GERMANIA E DANIMARCA: IL RUOLO DELL'AUTORITÀ COMPETENTE E DEL VETERINARIO AZIENDALE NELLA GESTIONE DEL FOCOLAIO

HENDRIK NIENHOFF

Dipl. ECPHMW

Spezialized swine veterinarian

Institute for Animal Health LUFA North West

Con il regolamento (CE) n. 2160/2003 del Consiglio Europeo, del 17 novembre 2003, sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti, ogni Paese europeo deve costruire un programma per il monitoraggio e la riduzione della Salmonella negli animali destinati alla produzione di alimenti.

La Germania ha messo in atto un regolamento per ridurre la Salmonella nei suini da macello per soddisfare questa domanda.

Il regolamento statale si applica alle aziende con un minimo di 50 posti da ingrasso. Il monitoraggio viene effettuato con la rilevazione di anticorpi al macello tramite ELISA. A tale scopo, vengono prelevati campioni di succo di carne di diaframma. La categorizzazione delle aziende è iniziata a marzo 2008. Un allevamento con più di 200 suini da ingrasso/anno deve prelevare un minimo di 60 campioni all'anno.

Inoltre, a livello privato dal 2004 vengono raccolti e organizzati dati mediante l'utilizzo di un database detto "Qualitype".

Entrambi i sistemi (statale e privato) utilizzano gli stessi "cut-off":

Livello anticorpale	Categoria	% Campioni Positivi
basso	Ι	Minore del 20%
medio	II	20-40%
alto	III	Più del 40%

Il "Cut-off" del monitoraggio è 40%, mentre quello del test è 10%. Il sistema statale utilizza i dati del sistema privato per il monitoraggio della salmonella e la relazione all'UE.

La Danimarca gestisce un programma molto simile ma applica un "cut-off" del 50% (test e numero di campioni).

I suini positivi non vengono scartati alla macellazione, ma esiste un sistema di *malus* di 0,005-0,01 € / kg di peso vivo alla macellazione per gli allevamenti Cat III, tale malus è stato applicato per ottenere una maggiore pressione sugli allevatori per ridurre la salmonella.

La *Salmonella choleraesuis* non è un grosso problema in Germania, né in Danimarca e viene considerato come un evento raro. I laboratori tedeschi e danesi riportano solo "pochi casi all'anno" (Pedersen et.al., 2015).

Il ruolo dei veterinari ufficiali regionali (a livello di azienda) consiste principalmente nella "raccolta dei dati" per il monitoraggio nazionale. I veterinari ufficiali non sono molto interessati al programma di monitoraggio, nè al riscontro di positività a livello di allevamento.

Il ruolo del veterinario aziendale è il ruolo di "gestore" del problema, il cui compito principale è di introdurre misure per ridurre la pressione della salmonella negli allevamenti, in modo da evitare il malus al macello. Le misure più applicate sono riportate nel riepilogo finale.

Riepilogo:

- S. coleraesuis non è un grosso problema in Germania e Danimarca
- I veterinari ufficiali raccolgono i dati, nessun azione repressiva in allevamenti positivi
- Al momento circa l'1,5% degli allevamenti è nella Cat III (alta pressione di salmonella)
- Le principali misure applicate dai veterinari aziendali sono: AIAO, biosicurezza interna, evitare rimescolamenti di suini, gestione dei roditori, controllare i riproduttori e gli allevamenti di riproduttori
- · Acidificare il mangime
- Aumentare orzo e segale (acido butirrico) nelle razione
- Preferire la farina al pellet
- Vaccinazione delle scrofe / scrofette in allevamenti "problematici".

SALMONELLA: PASSATO, PRESENTE E POSSIBILE FUTURO IN SPAGNA

JAVIER ROQUES MATA

In Spagna, i produttori non percepiscono la Salmonella come un problema clinico nella produzione e negli allevamenti, anche se questa situazione cambierà sicuramente con la riduzione dell'uso di antibiotici e il bando dell'ossido di zinco. La salmonella come zoonosi rimane una questione a parte.

Dopo la relazione EFSA 2006-2007 sulla prevalenza della Salmonella nei linfonodi dei suini macellati nei diversi paesi dell'UE, dove la Spagna era in cima alla lista, il governo spagnolo ha creato un gruppo di lavoro con tutti i settori produttivi coinvolti, per determinare i miglioramenti da apportare al programma di controllo.

Oltre ai controlli delle materie prime, dei mangimi e nei macelli, è stato necessario sviluppare un programma negli allevamenti, allo scopo di ridurre la presenza di Salmonella e la sua trasmissione tra gli animali.

A tal fine, è stato necessario effettuare *in primis* un lavoro di individuazione dei punti critici, da controllare al fine di stabilire successivamente le opportune misure correttive per ciascuno di essi.

I due obiettivi da valutare per lo sviluppo del programma di controllo erano i seguenti:

Fattori correlati all'introduzione dell'infezione:

- Aziende a ciclo chiuso (Fase 1,2 e 3)
- Assenza di edifici di quarantena
- Contaminazione degli stabili attraverso fomiti (stivali, utensili, materiale di lavoro, ecc.)
- Negli ingrassi con più stalle/lotti gli stivali dovrebbero essere dedicati per ogni stalla/ lotto
- Un'alternativa potrebbe essere la presenza di vaschette per il lavaggio delle calzature all'ingresso di ogni stalla.
- Assenza di procedure di pulizia e disinfezione di routine per utensili, materiale, ecc. o la frequenza con cui vengono applicate tali procedure
- Presenza di roditori, uccelli o animali domestici all'interno degli stabili
- Ingresso di persone provenienti dall'esterno dell'azienda. Frequenza
- Materiale monouso o dedicato (tuta, stivali, ecc.) in azienda per eventuali visite
- Restrizioni all'ingresso in azienda per le persone che hanno visitato altri allevamenti di suini nelle ultime 24-48 ore
- Sistema di ingresso dei suini negli allevamenti da ingrasso (AI/AO, a fasi, continuo, ecc.). Tutti i possibili sistemi dovrebbero essere considerati
- Origini (numero) dei suini da ingrasso (più provenienze potrebbero essere associate a una maggiore prevalenza di infezione)
- Pulizia e disinfezione di camion per il trasporto di animali, presenza di animali provenienti da altri allevamenti sul camion
- Frequenza di accesso dei camion (mangimi, trasporto di animali, letame, ecc.) all'interno del perimetro aziendale
- Accesso dei trasportatori alle stalle
- Frequenza di pulizia e disinfezione dei silos
- Provenienza dell'acqua
- Situazione dei sistemi di sanificazione/clorazione dell'acqua.

Fattori correlati al mantenimento e alla diffusione dell'infezione

- Livello di stress degli animali
- Densità eccessiva. La legislazione, indica i metri quadrati per animale a cui dobbiamo adeguarci, se possiamo dare ancora più spazio per animale, molto meglio
- Separazione dei box (contatto diretto o meno con gli animali del box vicino)
- Pavimento fessurato
- Raggruppamento dei suini da ingrasso in base al peso (Rostagno et al., 2009)
- Pulizia e disinfezione inadeguate dei box e del sistema di ventilazione... e le vaschette per la disinfezione delle calzature?
- Assenza o brevissimo periodo di vuoto sanitario della stalla
- Presentazione, variazione e qualità degli alimenti.

Con i risultati ottenuti, l'impatto di potenziali misure correttive è stato valutato da 1 a 5, dove 5 era l'opzione migliore da eseguire, sulla base di:

- Facilità
- Efficacia
- · Costo zero.

In conformità con questi criterii, è stata stabilita una check list (Figura 1) per l'audit che ha consentito:

- Identificazione dei punti di rischio;
- Sviluppare un piano di controllo;
- Verificare le conseguenze delle misure di controllo applicate.

Sección	Criterio		Observacione
Caracteristicas generales experiodación	Tipo de explotación:	Cido cerrado completo Transición+cebo (we an-to-finish) Cebo TD/TF Cebo en fases	
	El vallado perimetral presenta deficiencias:	B SI No	
	Fosa de purin situada de tal forma que para la recogida no se accede a la explotación	□ Si □ No	
	Posibilidad de contacto fisico entre cerdos o dejecciones de diferentes corrainas (p. ej separadas por barrotes):	Si No	
	Porcentaje medio de suelo con regilia en los cub iculos de lals navels de cebo:	0 % < 50% 50-100% 100%	
	Tipo de bebedero:	Chupete en cazoleta Chupete en tolva Chupete independiente	
	Existen locales de cuarentena (l'azaretos) para animales de cebo (separación de animales enfermos):	Si No	
	Uten alios y equipos (botas, monos, jeringas, etc.) exdusivos para lazaretos o desinfectados tras su uso:	Si No	
	Libro de registro de actuaciones de desinfección en el lazareto:	Si No	
	Presencia de pedituvios en la entrada de los lazaretos:	⊟ SI No	
	Se esparcen purines en las auperficies pròximas a la explotación:	Si No	
	Existencia de otras explotaciones de cerdos y aves alrededor (<1 km);	□ Si □ No	
Acceso de vehiculos	Número medio de vehículos que entran por semana:		9
versculos	Registro de entrada de vehículos (fecha, matrícula, razón de la visita, último contacto con una granja):	Si No	
	Vado u otro sistema de desinfección (p. ej arco de desinfección, etc.) en adivo cuando entran vehículos:	□ Si □ No	
	Si existe un arco de desinfección, se verifica su mantenimiento y correcto funcionamiento de forma rufinaria (libro de registro actualizado):	B Si No	
	Si existe vado, se mantiene en condiciones adecuadas para su funcionamiento:	Si No	
	Se compruebs el estado higiénico y el certificado de L+D de vehículos de transporte de animales:	⊟ Si No	
	Los conductores de camiones entran a las haves con equipos de protección (mono y calzas de la explotación o de sechables):	Siempre A veraes Nunca No entran nunca a naves	
	Vehículos de uso personal se quedan siempre en el exterior del perimetro de vallado de la explotación:	□ Si □ No	
Acceso de personas	Registro de entrada de personas (fecha, razón de la visita, último contacto con una granja):	Si No	1
	Protocolo de bioseguridad para visitantes establecido por escrito:	∃ si No	
	Existen equipos de protección para visitantes preparados para su uso:	Si No	
	Número de equipos de protección:		

Figura 1. Check list per il controllo della Salmonella in allevamento.

Come sono state verificate le misure di controllo:

- 1. Campioni fecali: con pool di campioni di tre box camminando con copricalzari e prelevando un totale di 2-5 campioni per stalla, a seconda delle sue dimensioni;
- 2. Sierologia (almeno 60 animali per azienda):

Classificazione delle aziende in 3 gruppi:

- alto rischio di positività > 40%
- rischio medio 20>40%
- basso rischio <20%.

Negli allevamenti peggiori i suini sono stati abbattuti alla fine della settimana e gli allevatori sono stati spinti a impegnarsi maggiormente nell'applicazione delle misure previste dal piano di controllo.

La presenza di Salmonella nelle feci non è continua e i valori sierologici possono rimanere

a lungo dal momento dell'infezione, quindi è consigliabile utilizzare entrambi i metodi di verifica, anche se non sono perfetti al 100%. Attualmente, i macelli effettuano anche controlli sierologici di routine casuali all'arrivo: dato che attualmente i vaccini contro la Salmonella non vengono utilizzati in Spagna, non vi è alcuna possibilità di interferenza tra gli anticorpi del vaccino e quelli dell'infezione di campo.

Attualmente non esistono dati ufficiali sulla situazione della Salmonella nei suini, ma se partiamo dai risultati dei controlli dei macelli, la situazione appare migliorata da quando sono state introdotte le misure di controllo.

Queste misure possono essere suddivise in tre gruppi:

Gestione e stato sanitario

Lo stress è uno dei principali fattori scatenanti per l'attivazione e l'eliminazione della Salmonella negli animali portatori. Pertanto, tutti quei momenti in cui gli animali saranno sottoposti a stress di una certa rilevanza dovrebbero essere considerati come punti critici di controllo della malattia: l'ingresso in azienda di nuovi riproduttori, la loro introduzione nel gruppo, il parto, lo svezzamento, l'ingresso in capannoni da ingrasso e il carico al macello. Controlli sierologici periodici, di circa 60 capi per allevamento, e di feci, permetteranno di conoscere la situazione iniziale e l'evoluzione delle misure adottate per il controllo della Salmonella.

Tutte quelle misure di gestione volte a ridurre lo stress (temperatura, ventilazione, raggruppamento degli animali durante tutto il periodo produttivo, densità, evitare lo stress nutrizionale causato dal digiuno prolungato e dal consumo eccessivo di mangime...) in questi momenti saranno un importante rinforzo alle altre misure di controllo.

Igiene e biosicurezza

Sono sicuramente una delle parti più importanti per il controllo della Salmonella. Una delle principali carenze che abbiamo riscontrato nelle aziende è che sono presenti piani di igiene e biosicurezza teoricamente molto ben pensati e dove l'obiettivo è quello di rispettare le normative vigenti, ma non vengono effettuati controlli periodici sulla reale efficacia di questi piani. Non è necessario concentrarsi solo su pareti, pavimenti, trogoli e abbeveratoi, ma anche controllare fosse, sistemi di ventilazione, vasche di lavaggio calzature, separazione tra box, camion per il trasporto di animali.

La presenza di strutture per la quarantena è importante, poiché l'arrivo di nuovi riproduttori in azienda di solito innesca, a causa dello stress, l'attivazione e l'eliminazione della Salmonella negli animali portatori, aumentando il rischio di trasmissione al resto degli animali nell'allevamento. Pertanto, si raccomanda vivamente l'uso di queste strutture per testare la presenza della Salmonella, l'applicazione di soluzioni quali acidi organici nell'acqua e/o nei mangimi per controllarne la diffusione, e verificare, prima della reintroduzione nel gruppo di produzione, che nessun animale sia escretore.

Evitare la presenza di roditori, uccelli o animali domestici all'interno degli stabili è un altro aspetto importante del controllo. C'è poco interesse a conoscere davvero l'efficacia dei programmi di controllo dei roditori, pur essendo un importante vettore di Salmonella negli allevamenti.

Alimentazione

Con la riduzione dell'uso di antimicrobici e il divieto dell'uso di ossido di zinco a livelli terapeutici, la nutrizione dei suinetti assume sempre più importanza. Dal punto di vista patologico, è preoccupante la comparsa di nuovi attori come *Brachyspira* o *Lawsonia* insieme a *E. coli* nella diarrea in svezzamento, che collaborano strettamente con la

moltiplicazione e l'attivazione della Salmonella. E dal punto di vista nutrizionale, le dinamiche di alimentazione dei suinetti vedono un periodo di digiuno post-svezzamento, cui segue un successivo periodo di consumo eccessivo, con consumi poi irregolari in cui si alternano periodi di consumo eccessivo, seguiti da altri di digiuno. Questi pattern alimentari irregolari portano a uno stress intestinale, che poi faciliterà anche la moltiplicazione e l'eliminazione della Salmonella. È quindi necessario da un lato una formulazione alimentare altamente controllata dal punto di vista nutrizionale che regoli proteine, energia e fibre nelle diverse fasi di svezzamento (una prima fase di adattamento allo svezzamento, seguita da una fase di accrescimento), combinata con additivi che aiutino a mantenere e migliorare la salute intestinale (acidi organici, enzimi, prebiotici, probiotici ...) e dall'altro una gestione dei mangimi che stimoli il consumo iniziale di mangime, già dalle prime ore dopo lo svezzamento, e aiuti a controllare il consumo eccessivo in seguito.

Perché la nutrizione è così importante all'inizio dello svezzamento? Perché i problemi alimentari in età precoce danno origine con più facilità a alterazioni della permeabilità digestiva e della salute intestinale in età adulta in situazioni di stress, causando l'attivazione e la gravità dei problemi digestivi, tra cui la salmonella.

Dobbiamo sempre ricordare la qualità dell'acqua, sia microbiologica che chimica. È il nutriente dimenticato, ma è quello che ha il maggiore impatto sulla salute intestinale: prima deve essere potabile, e poi può essere integrata con additivi che ci possono aiutatre al controllo della salute intestinale.

In sintesi, per controllare la Salmonella dobbiamo rafforzare al massimo la prevenzione:

- Biosicurezza interna ed esterna, compreso il trasporto di materiali, animali e mangimi
- Stress: identificare i momenti a rischio e controllare altri agenti patogeni intestinali
- Formulazione dei mangimi, additivi e gestione dei mangimi
- Qualità dell'acqua e additivi
- Vaccinazione: in Spagna non è di uso comune ora, ma come nell'allevamento di pollame, sarà più che probabile che sia necessario includerla nel nostro piano di vaccinazione nel prossimo futuro. Lo svantaggio di questa misura è che non saremo più in grado di utilizzare la sierologia per misurare la situazione nei nostri allevamenti in quanto non saremo in grado di distinguere tra anticorpi vaccinali e naturali.



IL VALORE AGGIUNTO DELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO NELLA GESTIONE DI UN FOCOLAIO DI SALMONELLOSI NEL SUINO

MAGISTRALI CHIARA FRANCESCA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati'

Gli ultimi dati di prevalenza di *Salmonella* spp. nell'allevamento suino disponibili a livello nazionale si riferiscono a circa 15 anni fa, quando vennero effettuati due studi trasversali in ambito europeo in seguito alla emanazione della Direttiva 2003/99/CE (EFSA, 2007). I dati si riferivano alla prevalenza microbiologica nei linfonodi al mattatoio e successivamente a campioni fecali prelevati negli allevamenti. In Italia, la prevalenza di *Salmonella* spp. nei linfonodi meseraici fu stimata al 16,5% (CI95%: 14,1%-19,1%), superiore alla media europea di 10,3% (CI95%: 9,2%-11.5%). A livello di produzione primaria, la prevalenza di *Salmonella* spp. negli allevamenti da riproduzione italiani era del 51,2%, mentre negli allevamenti da produzione si collocava al 43,9% (EFSA, 2008).

Dal 2008 in poi, non sono stati effettuati interventi sistematici per mitigare la diffusione di questo batterio nella filiera, e quindi è ragionevole aspettarsi che l'elevata prevalenza di *Salmonella* spp. nei suini e negli allevamenti italiani non abbia subito forti diminuzioni. In effetti, i dati raccolti da studi puntuali effettuati nei mattatoi nel corso degli ultimi 10 anni indicano prevalenze di *Salmonella* spp. del 34,6% a livello ciecale e del 19.9% a livello di linfonodi meseraici (Bonardi et al., 2016; Pesciaroli et al., 2017).

Per quanto riguarda la prevalenza dei diversi sierotipi, nelle stime europee la prevalenza di *S.* Typhimurium (STM) nei linfonodi al mattatoio era dell'1,6%, quella negli allevamenti da riproduzione del 2,7% e negli allevamenti da produzione del 5,6% (EFSA, 2007; EFSA, 2008). I dati raccolti nel corso degli stessi studi effettuati al mattatoio indicano come sierotipi più frequenti *S.* Derby e la variante monofasica di STM, *S. enterica* subsp. *enterica* 4, [5],12:i-(mTM), seguita da *S.* London e *S.* Rissen (Bonardi et al., 2016; Pesciaroli et al., 2017). Nel corso degli ultimi venti anni infatti mTM ha progressivamente soppiantato STM negli allevamenti suini ed è divenuta il terzo sierotipo più frequentemente isolato dai casi umani di salmonellosi in Europa, dopo *S.* Enteritidis e STM (D'Incau et al., 2021; EFSA, 2021)food, animals and feed are provided and interpreted historically. Two events impacted 2020 MS data collection and related statistics: the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19.

La salmonellosi del suino come problema clinico e di sanità pubblica

A fronte dell'elevata prevalenza di *Salmonella* negli allevamenti suini sopra descritta, il numero di focolai di salmonellosi segnalati in Italia, circa venti nel periodo 2017-2021, appare molto limitato (Vetinfo, 2022). Tuttavia, è probabile che questo numero sia fortemente sottostimato, basandosi sull'obbligo di notifica in base al Regolamento di Polizia Veterinaria (d.P.R. 8 febbraio 1954, n. 320) e quindi su una sorveglianza di tipo passivo. Infatti, la sorveglianza passiva è per sua natura non sistematica e si presta facilmente al rischio di sotto-notifica. Dal 21 aprile 2021, data di introduzione dell'*Animal Health Law* (Regolamento EU 2016/429), l'obbligo di notifica dei casi di salmonellosi suina è decaduto.

I focolai di salmonellosi rappresentano un problema di sanità e benessere degli animali e di carattere economico per le perdite dirette ed indirette legate alla malattia. Da un punto di vista di sanità pubblica, i focolai rappresentano innanzitutto un pericolo per l'elevata diffusione del patogeno che li caratterizza. Dati derivati da infezioni sperimentali riferiti a STM che utilizzano

seeder pigs, vale a dire suinetti infettati sperimentalmente poi messi a contatto con suini sani, indicano che gli animali malati eliminano con le feci circa 10⁵ unità formanti colonia (UFC)/g e che due seeder pigs sono in grado di infettare nell'arco di 1-2 gg un intero gruppo di circa venti suini (Michiels et al., 2012). In presenza di suini sintomatici, il numero di animali eliminatori aumenta in modo esponenziale, mentre la carica batterica, in UFC per grammo di feci, è molto più elevata rispetto alle forme subcliniche, dove si attesta generalmente a 10² UFC/g di feci (EFSA, 2010). La contaminazione delle strutture è un fattore chiave per la diffusione di Salmonella e per la sua persistenza negli allevamenti e lungo la filiera (Lynch et al., 2017; Magistrali et al., 2011). Inoltre, anche se i focolai di salmonellosi si collocano generalmente nel post-svezzamento o nella prima fase di magronaggio, lontano dal periodo di macellazione, la presenza di un elevato numero di portatori si traduce in una accresciuta possibilità di contaminazione delle carcasse. Infatti, al momento del trasporto al mattatoio, si assiste ad una riattivazione della infezione, con un conseguente aumento del rischio di contaminazione delle strutture e di trasmissione ad altri animali (Bolton et al., 2021; Casanova-Higes et al., 2017; EFSA, 2010).

Non va inoltre trascurato l'effetto dei focolai clinici di salmonellosi sulla antibiotico-resistenza. A fronte della presenza di una sintomatologia può divenire necessario effettuare una terapia antibiotica e quindi esercitare una pressione selettiva per lo sviluppo di resistenze. Questo evento è particolarmente indesiderato in *Salmonella*, un microrganismo che si trasmette direttamente all'uomo e che acquisisce facilmente la capacità di resistere agli antibiotici, come dimostrato dalla recente emergenza di geni *mcr*, codificanti la resistenza a colistina. La presenza di geni *mcr*, è stata infatti segnalata in ceppi di mTM isolati in Italia sia nel suino che nell'uomo (Luo et al., 2020).

Il basso numero di focolai di salmonellosi suina segnalato a livello nazionale appare in linea con quanto disponibile negli archivi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati' (IZSUM), dove sono descritti circa 30 casi nel periodo 2015-2022. Interessante notare come la distribuzione dei sierotipi sia diversa rispetto a quella descritta nei lavori al mattatoio. Infatti, accanto a STM e mST si trova *Salmonella enterica* Choleraesuis, un sierotipo raramente identificato nelle indagini sulla prevalenza al mattatoio. Il dato è in accordo a quanto riportato in letteratura: a fronte di numerosi sierotipi isolati dal suino in forme subcliniche di salmonellosi, i casi clinicamente manifesti si riconducono alla presenza di 2-3 sierotipi, STM e mST e appunto, *S.* Choleraesuis. Osservando la tipologia di allevamenti, si nota come la maggior parte dei casi da *S.* Choleraesuis si sia registrata in allevamenti che ospitavano anche cinghiali o comunque estensivi, a differenza dei casi di mST, osservati in allevamenti intensivi, spesso integrati in grandi filiere. Inoltre, mentre i casi di mST erano accompagnati da ricadute negli anni successivi all'apertura dei focolai, nei casi da *S.* Choleraesuis non si sono registrate recidive.

La salmonellosi suina da S. Choleraesuis

S. Choleraesuis è un sierotipo adattato al suino che causa prevalentemente setticemia e polmonite (Pedersen et al., 2015). Pur potendo causare enterocoliti, S. Choleraesuis è un sierotipo meno legato all'apparato gastro-intestinale rispetto ad altri sierotipi di Salmonella enterica, e quindi la diarrea non è un sintomo caratteristico, soprattutto nella fase iniziale della malattia (Pedersen et al., 2015). La comparsa delle forme cliniche di salmonellosi è spesso conseguenza della presenza altre infezioni, come quelle determinate da PCV2 o da PRRSV (Pedersen et al., 2015). Nei focolai di salmonellosi da S. Choleraesuis si osservano solitamente una elevata morbilità e mortalità. Nell'uomo, S. Choleraesuis è raramente isolata, ma i casi descritti si caratterizzano per forme di infezioni extra-intestinali e quindi da una particolare gravità (Gil Molino et al.,

2019; Papić et al., 2021; Uelze et al., 2021). Analogamente ad altri sierotipi di *S. enterica*, *S.* Choleraesuis è dotata di notevole resistenza nell'ambiente esterno, potendo sopravvivere nelle feci essiccate fino a 13 mesi (Ernholm et al., 2022; Pedersen et al., 2015).

In base ai dati di prevalenza europei sopra riportati, S. Choleraesuis, molto frequente nel suino negli anni '50 e '60 del secolo scorso, non è tra i sierotipi più frequentemente riscontrati negli allevamenti negli ultimi vent'anni (Longo et al., 2019; Pedersen et al., 2015). É interessante tuttavia notare come si sia recentemente assistito ad un aumento delle descrizioni di focali da S. Choleraesuis in Europa nella letteratura scientifica. Questo patogeno è stato infatti segnalato sia nei cinghiali sia nei suini domestici in Spagna, Croazia, Germania, Italia e Danimarca (Gil Molino et al., 2019; Longo et al., 2019; Papić et al., 2021; Pedersen et al., 2015; Uelze et al., 2021). Gli isolati provenienti dai suini selvatici e da quelli domestici appartengono spesso agli stessi *cluster*, indicando la possibilità di trasmissione tra le due popolazioni e suggerendo che il cinghiale possa costituire da reservoir per S. Choleraesuis (Ernholm et al., 2022; Leekitcharoenphon et al., 2019; Uelze et al., 2021). S. Choleraesuis è tuttavia in grado di persistere nella popolazione domestica. In Danimarca, la presenza di focolai di infezione dopo anni di mancate segnalazioni e in assenza di contatti con la popolazione selvatica ha fatto ipotizzare una probabile origine nella contaminazione dei mezzi di trasporto, attraverso gli scambi commerciali di animali vivi con paesi dove l'infezione è endemica (Pedersen et al., 2015). In Italia, sono stati segnalati sia casi nella popolazione suina domestica che nella selvatica. Uno studio recente effettuato in Veneto ha evidenziato come i ceppi provenienti dai cinghiali siano strettamente correlati tra loro, ma distinti da quelli isolati da suini domestici nella stessa area geografica. Interessante come notare come i determinanti di resistenza antibiotica (vs aminoglicosidi, beta-lattamici, sulfonamidi e trimethoprim) fossero presenti solo nei ceppi da allevamento, confermando l'importanza della pressione selettiva generata dai trattamenti (Longo et al., 2019).

In conclusione, per l'introduzione di *S*. Choleraesuis in allevamento e per la sua trasmissione intraziendale sono particolarmente importanti le movimentazioni degli animali, il contatto con i suidi selvatici e la contaminazione delle strutture e dei mezzi di trasporto. Il sospetto diagnostico si deve associare alla presenza di morti improvvise e di sintomatologia respiratoria, anche in assenza di diarrea. Per confermare il sospetto diagnostico, è opportuno conferire gli animali morti improvvisamente, ed evitare campioni fecali o ambientali.

La salmonellosi suina da S. Typhimurium e da variante monofasica di Salmonella Typhimurium (mST)

A differenza di *S.* Cholearesuis, mST è un sierotipo costantemente registrato nei prodotti derivati dal suino e nei casi umani di salmonellosi in Europa. Questo sierotipo, emerso alla fine degli anni '80 in Europa e strettamente associato all'allevamento suino, ha conosciuto una forte espansione negli ultimi vent'anni (Sun et al., 2020). mST è anche tra i primi tre sierotipi più frequentemente isolati da casi di salmonellosi umana, essendo stato responsabile di circa il 9% dei focolai segnalati nel 2021 in Europa (EFSA, 2022). Nel suino, mST mantiene la patogenicità di STM, come dimostrato da infezioni sperimentali (Cevallos-almeida et al., 2019). É quindi associata prevalentemente a forme di enterocolite. mST, e in particolare il clone ST34, presenta alcune caratteristiche peculiari, che la rendono capace di persistere negli allevamenti intensivi. Probabilmente, sono state la sua capacità di resistere all'azione selettiva dei metalli pesanti, grazie ai geni *sopE* e *perC*, e la produzione di biofilm, che ne hanno favorito la persistenza e l'espansione nella produzione primaria (Tassinari et al., 2019; Vázquez et al., 2022). ST34 ha anche dimostrato di potere acquisire con facilità geni di resistenza agli antibiotici, ad esempio verso i chinoloni e colistina (Diaconu et al., 2021).

Negli allevamenti nei quali si sono segnalati casi di salmonellosi, mST persiste per anni; è particolarmente presente nel post-svezzamento, ma viene eliminata anche dagli animali all'ingrasso, seppure con prevalenze inferiori (Martelli et al., 2017; Weaver et al., 2017). L'infezione spesso si trasmette tra gruppi di animali per via indiretta, attraverso strutture contaminate (Magistrali et al., 2011; Martelli et al., 2017). Gli uccelli selvatici e i roditori possono fungere da serbatoio di infezione, e contribuire alla persistenza di questo patogeno in allevamento (Martelli et al., 2017). I suini rimangono portatori di mST fino alla macellazione e questo può determinare una contaminazione delle carcasse e del prodotto finito (D'Avino et al., 2014). Inoltre mST conserva l'ampio *range* d'ospite di STM, e quindi può infettare specie diverse dal suino: oltre all'uomo, è presente negli allevamenti bovini e in quelli avicoli (EFSA, 2022; Martelli et al., 2017).

In conclusione, l'introduzione di mTM in allevamento può avvalersi di diverse fonti di contaminazione, non solo i suini, ma anche animali sinantropi, come i ratti o gli uccelli, gli alimenti, le strutture o i materiali contaminati. Tutte queste fonti possono poi giocare un ruolo per la sua trasmissione intraziendale. Il sospetto diagnostico si deve associare alla presenza di ipertermia e di sintomatologia enterica. Per confermare il sospetto diagnostico, è consigliabile conferire gli animali morti, perché l'isolamento dalle feci non è sufficientemente specifico, data la frequenza di suini portatori sani o subclinici di mTM.

La diagnosi di laboratorio come strumento di gestione

Le due infezioni da mST e da *S.* Cholaeraesuis sono profondamente differenti in termini di caratteristiche epidemiologiche, cliniche e di potenzialità zoonosiche. L'esame colturale, seguito dalla caratterizzazione dell'isolato è l'unico test in grado di fornire un supporto diagnostico adeguato. Una diagnosi eziologica rappresenta un momento fondamentale per la gestione dei focolai, permettendo l'adozione di misure di controllo adeguate al ceppo identificato e, qualora questo sia indispensabile, l'utilizzo di antibiotici appropriato. Le salmonelle isolate confluiscono alla rete Enter-Vet, permettendo di stabilire le fonti di contaminazione per i casi umani (https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/salmonella/enter-vet). Inoltre, i dati di sensibilità antibiotica vengono integrati nel piano di monitoraggio armonizzato della resistenza antimicrobica dei batteri zoonotici e commensali, in accordo con la Decisione 2013/652/UE, consentendo una valutazione delle resistenze presenti e la rapida identificazione di quelle emergenti.

Nella scelta delle matrici da sottoporre al laboratorio per la conferma diagnostica è fondamentale ricordare come il solo rilievo di Salmonella in allevamento non rappresenti un dato indicativo, data l'elevata prevalenza di portatori asintomatici sopra descritta. É importante che l'isolato appartenga a uno dei sierotipi associati a malattia nel suino. Inoltre, un caso sporadico di salmonellosi potrebbe essere legato alla presenza di infezioni concomitanti. Quindi l'isolamento di Salmonella diventa suggestivo per la presenza di un focolaio quando sia associato alla caratteristica sintomatologia e supportato da dati di morbilità e mortalità relativi ai settori colpiti. Una volta confermata la presenza di un focolaio sarà possibile adottare misure di controllo adeguate al sierotipo coinvolto. mST in particolare è un agente di zoonosi rilevante: va quindi sviluppato un piano di controllo. Subito in seguito alla conferma dei casi è opportuno applicare il più precocemente possibile, indipendentemente dal sierotipo coinvolto, la segregazione dei gruppi colpiti, la applicazione del tutto pieno/tutto vuoto, la pulizia e disinfezione degli ambienti. La pulizia pre-disinfezione è fondamentale, perché i disinfettanti sono rapidamente inattivati in presenza di materia organica. L'intervento deve includere gli elementi lontani dagli animali, come i davanzali o i ventilatori, perché Salmonella viene veicolata dalla polvere e interessare anche le fessure, dove il batterio persiste, anche per la sua capacità di produrre

biofilm (Martelli et al., 2017). Altri interventi sono cruciali solo per il controllo di uno dei due sierotipi: ad esempio, gli interventi di derattizzazione sono fondamentali nella gestione di mST, non di *S.* Cholaeraesuis. Date le caratteristiche epidemiologiche di *Salmonella*, è chiaro che una riduzione della diffusione intra-allevamento è un obiettivo da perseguire nel lungo termine, in particolare per mST. In questo caso, una condivisione dell'obiettivo di mitigazione tra il veterinario aziendale, la sanità pubblica e soprattutto l'allevatore appare fondamentale.

La diagnosi di laboratorio rientra tra gli strumenti per la verifica dell'andamento del piano di autocontrollo. Infatti, è necessario mantenere un servizio diagnostico per tracciare la presenza di casi clinici. Nell'applicazione del piano, sarà opportuno monitorare l'efficacia degli interventi di pulizia e disinfezione attraverso l'uso di tamponi ambientali. Questo monitoraggio è importante per mantenere viva l'attenzione verso questi interventi. Nel caso di mST, la riduzione della prevalenza di tamponi ambientali positivi è spesso il primo segnale dell'efficacia degli interventi (Martelli et al., 2017).

Le misure di biosicurezza rappresentano uno dei possibili interventi per ridurre la circolazione di *Salmonella* negli allevamenti suini. Altri interventi comprendono il trattamento dell'alimento e dell'acqua di abbeverata, come l'impiego di acido sorbico, butirrato di sodio, miscele di acido citrico o olii essenziali e la vaccinazione, un intervento spesso risolutivo nella gestione dei focolai (Bearson., 2022; Bernad-Roche et al., 2022; Lynch et al., 2017).

In conclusione, la diagnosi di laboratorio rappresenta un elemento fondamentale per la gestione dei focolai di salmonellosi negli allevamenti e un utile strumento per il monitoraggio della efficacia dei piani di autocontrollo. L'invio di materiali diagnostici permette di avere dati sulle caratteristiche di *Salmonella* circolanti nel suino rilevanti in termini di sanità animale e sanità pubblica. É quindi auspicabile il regolare ricorso al laboratorio diagnostico nei casi sospetti di salmonellosi del suino.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Bearson., S. M. (2022). Salmonella in Swine: Prevalence, Multidrug Resistance, and Vaccination Strategies. *Annu Rev Anim Biosci.*, *Feb*(10), 373–393. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-013120-043304.
- Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C. M., & Mainar-Jaime, R. C. (2022). Salmonella Shedding in Slaughter Pigs and the Use of Esterified Formic Acid in the Drinking Water as a Potential Abattoir-Based Mitigation Measure. *Animals*, 12(13), 1–16. https://doi.org/10.3390/ani12131620
- 3. Bolton, D., Bover-cid, S., Chemaly, M., Davies, R., Cesare, A. De, Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Ru, G., Simmons, M., Berendonk, T., Skandamis, P., Suffredini, E., Cavaco, L. M., Gaze, W., Schmitt, H., Topp, E., Guerra, B., ... Peixe, L. (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain o. 19(April). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651
- 4. Bonardi, S., Alpigiani, I., Bruini, I., Barilli, E., Brindani, F., Morganti, M., Cavallini, P., Bolzoni, L., & Pongolini, S. (2016). Detection of Salmonella enterica in pigs at slaughter and comparison with human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 44–50. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.005
- Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., & Mainar-Jaime, R. C. (2017). Influence of Onfarm pig Salmonella status on Salmonella Shedding at Slaughter. *Zoonoses and Public Health*, 64(5), 328–336. https://doi.org/10.1111/zph.12301
- Cevallos-almeida, M., Martin, L., Houdayer, C., & Rose, V. (2019). Experimental infection of pigs by Salmonella Derby, S. Typhimurium and monophasic variant of S. Typhimurium: Comparison of colonization and serology. *Veterinary Microbiology*, 231(March), 147–153. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.003

- 7. D'Avino, N., Cucco, L., Sorbelli, V. B., Ciuti, F., Ortenzi, R., Paniccià, M., Staffolani, M., Pezzotti, G., & Magistrali, C. F. (2014). Salmonella burden throughout the swine production chain in central Italy. *Large Animal Review*, 20(4).
- 8. 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), 1–7. https://doi.org/10.1186/s40813-021-00214-1
- 9. Diaconu, E. L., Alba, P., Feltrin, F., Di Matteo, P., Iurescia, M., Chelli, E., Donati, V., Marani, I., Giacomi, A., & Franco, A. (2021). *Emergence of IncHI2 Plasmids With Mobilized Colistin Resistance (mcr) 9 Gene in ESBL-Producing , Multidrug-Resistant Salmonella Typhimurium and Its Monophasic Variant ST34 From Food-Producing Animals in Italy.* 12(July), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705230
- 10. EFSA. (2007). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on a proposal for technical specifications for a baseline survey on the prevalence of Salmonella in breeding pigs. EFSA Journal, 5(5), 1–111. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.99r
- 11. EFSA. (2010). Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs. *EFSA Journal*, 8(4), 1–90. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1547
- 12. EFSA. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, *19*(12). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971
- 13. EFSA. (2022). *The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. 20*(November). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666
- 14. Ernholm, L., Sternberg-Lewerin, S., Ågren, E., Ståhl, K., & Hultén, C. (2022). First Detection of Salmonella enterica Serovar Choleraesuis in Free Ranging European Wild Boar in Sweden. *Pathogens*, *11*(7), 1–10. https://doi.org/10.3390/pathogens11070723
- 15. Gil Molino, M., Risco Pérez, D., Gonçalves Blanco, P., Fernandez Llario, P., Quesada Molina, A., García Sánchez, A., Cuesta Gerveno, J. M., Gómez Gordo, L., Martín Cano, F. E., Pérez Martínez, R., Varela Fernández, E., & Rey Pérez, J. (2019). Outbreaks of antimicrobial resistant Salmonella Choleraesuis in wild boars piglets from central-western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 225–233. https://doi.org/10.1111/tbed.13003
- Leekitcharoenphon, P., Sørensen, G., Löfström, C., Battisti, A., Szabo, I., Wasyl, D., Slowey, R., Zhao, S., Brisabois, A., Kornschober, C., Kärssin, A., Szilárd, J., Černý, T., Svendsen, C. A., Pedersen, K., Aarestrup, F. M., & Hendriksen, R. S. (2019). Cross-border transmission of salmonella choleraesuis var. kunzendorf in European pigs and wild boar: Infection, genetics, and evolution. *Frontiers in Microbiology*, 10(feburay), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00179
- Longo, A., Losasso, C., Vitulano, F., Mastrorilli, E., Turchetto, S., Petrin, S., Mantovani, C., Dalla Pozza, M. C., Ramon, E., Conedera, G., Citterio, C. V., Ricci, A., Barco, L., & Lettini, A. A. (2019). Insight into an outbreak of Salmonella Choleraesuis var. Kunzendorf in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 238(September), 108423. https://doi.org/10.1016/j. vetmic.2019.108423
- 18. Luo, Q., Wang, Y., & Xiao, Y. (2020). Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (mcr) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health*, 2(2), 71–78. https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.05.001
- 19. Lynch, H., Leonard, F. C., Walia, K., Lawlor, P. G., Duffy, G., Fanning, S., Markey, B. K., Brady, C., Gardiner, G. E., & Argüello, H. (2017). Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat Salmonella in grower pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 139, 50–57. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.008

- 20. Magistrali, C. F., D'Avino, N., Ciuti, F., Cucco, L., Maresca, C., Paniccià, M., Scoccia, E., Tentellini, M., & Pezzotti, G. (2011). Longitudinal study of fecal Salmonella shedding by sows. *Journal of Swine Health and Production*, *19*(6).
- 21. Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T., Gosling, R. J., Fordon, S., Tatone, A., Callaby, R., 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*. 1–20.
- 22. Michiels, J., Missotten, J., Rasschaert, G., Dierick, N., Heyndrickx, M., & De Smet, S. (2012). Effect of organic acids on Salmonella colonization and shedding in weaned piglets in a seeder model. *Journal of Food Protection*, 75(11), 1974–1983. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-210
- Papić, B., Kušar, D., Mićunović, J., Vidrih, Š., Pirš, M., Ocepek, M., & Avberšek, J. (2021). Genomic insights into Salmonella Choleraesuis var. Kunzendorf outbreak reveal possible interspecies transmission. *Veterinary Microbiology*, 263(August). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109282
- Pedersen, K., Sørensen, G., Löfström, C., Leekitcharoenphon, P., Nielsen, B., Wingstrand, A., Aarestrup, F. M., Hendriksen, R. S., & Baggesen, D. L. (2015). Reappearance of Salmonella serovar Choleraesuis var. Kunzendorf in Danish pig herds. *Veterinary Microbiology*, 176(3–4), 282–291. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.004
- Pesciaroli, M., Cucco, L., De Luca, S., Massacci, F. R., Maresca, C., Medici, L., Paniccià, M., Scoccia, E., Staffolani, M., Pezzotti, G., & Magistrali, C. F. (2017). Association between pigs with high caecal Salmonella loads and carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 242. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.021
- 26. Sun, H., Wan, Y., Du, P., & Bai, L. (2020). The Epidemiology of Monophasic Salmonella Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, *17*(2), 87–97. https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2676
- 27. Tassinari, E., Duffy, G., Bawn, M., Burgess, C. M., McCabe, E. M., Lawlor, P. G., Gardiner, G., & Kingsley, R. A. (2019). Microevolution of antimicrobial resistance and biofilm formation of Salmonella Typhimurium during persistence on pig farms. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45216-w
- 28. Uelze, L., Bloch, A., Borowiak, M., Grobbel, M., Deneke, C., Fischer, M., Malorny, B., Pietsch, M., Simon, S., Szabó, I., Tausch, S. H., & Fischer, J. (2021). What wgs reveals about salmonella enterica subsp. Enterica in wildlife in germany. *Microorganisms*, *9*(9), 1–24. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091911
- 29. Vázquez, X., García, V., Fernández, J., Bances, M., Toro, M. De, Ladero, V., Rodicio, R., & Rodicio, M. R. (2022). *Colistin Resistance in Monophasic Isolates of Salmonella enterica ST34 Collected From Meat-Derived Products in Spain, With or Without. 12*(January), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735364
- 30. Weaver, T., Valcanis, M., Mercoulia, K., Sait, M., Tuke, J., Kiermeier, A., Hogg, G., Pointon, A., Hamilton, D., & Billman-jacobe, H. (2017). Longitudinal study of Salmonella 1, 4, [5], 12:i:-shedding in five Australian pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, *136*, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.11.010
- 31. Vetinfo, Sistema Informativo Veterinario. Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario. https://www.vetinfo.it/sso_portale/accesso.pl, accesso 20 settembre 2022)
- 32. Regolamento (Ue) 2016/429 Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 9 marzo 2016 relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale»). Available online at: https://eurlex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32016R0429&from=it
- DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA 8 febbraio 1954, n. 320 Regolamento di polizia veterinaria. (GU Serie Generale n.142 del 24-06-1954 Suppl. Ordinario)

ATTI DEL XLVIII MEETING ANNUALE

Pescantina (VR), 30-31 Marzo 2023

ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP: NUOVI STRUMENTI A SUPPORTO DEL MEDICO VETERINARIO PER UTILIZZO CONSAPEVOLE

MAISANO A.M.¹, BARBERIO A.², LUPPI A.¹, VEZZOLI F.¹, ROSIGNOLI C.¹, MAGISTRALI C.³, PAPA P.³, GAGLIAZZO L.², VIO D.², ALBORALI G.L.¹, CATANIA S.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è il risultato della capacità di adattamento dei batteri di resistere a determinate molecole antimicrobiche, e risulta essere il frutto di un adattamento naturale delle specie microbiche alle avverse condizioni, permettendo quindi il mantenimento della specie. Tale meccanismo di sopravvivenza già ipotizzato da Fleming, congiuntamente ad un importante utilizzo di molecole antimicrobiche negli ultimi decenni, ha permesso a numerose specie batteriche di raggiungere resistenze multiple ai farmaci determinando un allarme globale riguardante la perdita di efficacia delle molecole antimicrobiche.

Purtroppo ci sono dati sempre più numerosi che indicano un diffuso utilizzo inappropriato degli antibiotici in tutti gli ambiti sanitari incluso il settore veterinario. Queste cattive pratiche di utilizzo possono contribuire alla più rapida comparsa di microrganismi multiresistenti che minacciano di pregiudicare molti dei più importanti avanzamenti del settore chimico farmaceutico dell'ultimo secolo. È sempre più evidente, ed è ormai considerato un concetto acquisito, che la resistenza batterica agli antimicrobici rappresenta un problema globale che va affrontato in una logica collaborativa ispirata al concetto di "One-Health", secondo il quale la salute umana e animale vanno salvaguardate senza settorialismi e senza prescindere dal contesto ambientale.

A seguito di ciò nell'ultimo decennio diverse attività sono state proposte al fine di limitare lo sviluppo ed il mantenimento delle resistenze antimicrobiche, in particolare il contenimento dell'utilizzo degli antimicrobici per alcune determinate categorie o specie ed il loro appropriato utilizzo risultano essere il perno fondamentale del sistema. Sicuramente in questo contesto la parte veterinaria può giocare e svolgere il proprio importante ruolo. Quindi al fine di preservare l'utilità di questi farmaci salvavita, tutti dobbiamo utilizzarli in maniera sempre più appropriata. La *stewardship* antibiotica si riferisce a tutti quegli interventi che mirano a promuovere l'uso ottimale degli antibiotici, inclusi la scelta del farmaco, la sua via di somministrazione, la durata della somministrazione ed in alcuni casi anche al suo dosaggio. Per contenere la resistenza agli antibiotici tutti i medici veterinari devono diventare "gestori" (*steward*) di questi farmaci, prescrivendoli attenendosi all'attuale legislazione [Regolamento (UE) 2019/6] ed in maniera appropriata, ed educando i propri colleghi e clienti all'uso corretto e consapevole di questa fondamentale risorsa medica che purtroppo diviene sempre più scarsa.

In particolare l'utilizzo appropriato e consapevole del farmaco in medicina veterinaria ed in particolare nel settori zootecnici è stato considerato come una importante sfida. Tale sfida in un primo tempo è stata vista come efficacia stessa del farmaco, finalizzata ad una riduzione delle perdite economiche con un intrinseco concetto zootecnico/produttivo, ma man mano che la consapevolezza di una medicina unica (*One Health*) e la responsabilizzazione della produzione di alimenti destinati al consumo umano hanno preso corpo, tale approccio zootecnico/produttivo ha lasciato gradualmente il posto ad un approccio maggiormente consapevole ed oggettivo a tutela di una medicina unica. Quindi il ruolo del medico

veterinario prescrittore diviene sempre più delicato e fondamentale, per svolgere oltre ai compiti ampiamente conosciuti, anche quello di partecipare in maniera attiva alla riduzione dell'antibiotico-resistenza attraverso l'utilizzo consapevole e ponderato del farmaco basando la scelta terapeutica su basi oggettive (steward).

Al fine di sostenere i medici veterinari e metterli in condizione di poter scegliere il farmaco sulla base di dati oggettivi, gli Istituti Zooprofilattici operanti nell'area vasta della pianura padana e nelle regioni dell'Umbria e delle Marche, hanno condiviso le metodiche per la valutazione della concentrazione minima inibente ed individuato una serie di molecole registrate sul territorio italiano con i loro rispettivi range di diluizione. Questo nuovo sistema ha permesso di fornire al medico veterinario clinico informazioni più dettagliate e precise finalizzate a supportare una scelta corretta ed oggettiva dell'eventuale trattamento farmacologico. permettendo inoltre una facile comparabilità dei dati. Tale sistema di condivisione ha inoltre creato le basi per una integrazione unica dei dati MIC prodotti attraverso piattaforme informatiche ampiamente conosciute come ClassyFarm. Una volta a regime tale sistema potrà permettere al medico veterinario di controllare in tempo reale tutti le sue analisi con metodica MIC, eseguiti nei differenti Istituti Zooprofilattici coinvolti in questo progetto, e riguardanti i propri casi clinici. Inoltre attraverso i sistemi informatici messi a disposizione potrà correlare a questi l'allevamento di provenienza o dell'intera filiera zootecnica di appartenenza. Tale possibilità permetterà quindi di utilizzare un dato storico di MIC per impostare protocolli terapeutici appropriati e maggiormente efficaci. Il monitoraggio periodico in allevamento effettuato eseguendo campioni ed analisi nel corso di eventi patologici permetterà da un lato di costruire un dato storico di allevamento, dall'altro di procedere celermente con una oggettiva scelta delle molecole e quindi una terapia appropriata e consapevole e se necessaria anche ai primi sintomi di malattia. Tale sistema permetterà quindi al comparto zootecnico ed in particolare al settore suinicolo di poter utilizzare in maniera appropriata e consapevole il farmaco attraverso la valutazione di dati oggettivi, permettendo quindi una partecipazione attiva alla lotta globale verso le antibiotico-resistenza.

ANTIBIOTICORESISTENZA DEI PATOGENI BATTERICI DEL SUI-NO E POSSIBILITÀ TERAPEUTICHE: LA SITUAZIONE ATTUALE

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE MAIN PATHOGENS OF SWINE AND TERAPEUTIC OPPORTUNITY: THE CURRENT STATE

BASSI PATRIZIA

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

Rruno Ubertini

INTRODUZIONE

La resistenza che numerose specie batteriche hanno acquisito negli anni ha portato alla progressiva riduzione delle disponibilità terapeutiche, congiuntamente alla maggior sensibilità che si è sviluppata recentemente nei confronti dell'uso prudente dell'antibiotico, in generale, e delle molecole considerate critiche per l'uomo, in particolare. La necessità di dati sempre più aggiornati ed aggregati, sia per scopo terapeutico che epidemiologico, ha portato alla condivisione da parte di alcuni istituti zooprofilattici sperimentali, nello specifico Lombardia e Emilia Romagna (IZSLER), Venezie (IZSVE) e Umbria e Marche (IZSUM); di metodiche di rilevazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) tramite pannelli di antibiotici comuni che potessero fornire un dato uniforme al veterinario aziendale indipendentemente dalla sede di analisi del campione; parallelamente, il dato confrontabile sul territorio permette di monitorare attentamente la situazione epidemiologica delle resistenze agli antibiotici. I dati del primo anno (2022) di utilizzo dei pannelli armonizzati sono quindi riportati di seguito per i principali agenti eziologici batterici che si incontrano nell'allevamento suinicolo, in modo da fornire una veduta complessiva della situazione attuale.

Materiali e Metodi

I dati di sensibilità dei diversi patogeni indagati alle molecole testate sono stati estrapolati dai database dei tre istituti zooprofilattici sperimentali Lombardia e Emilia Romagna (IZSLER), Venezie (IZSVE) e Umbria e Marche (IZSUM) nell'ambito dell'attività diagnostica operata nell'anno 2022. Le molecole testate fanno parte di pannelli armonizzati utilizzati dai tre istituti che variano per enterobatteri gram negativi, patogeni respiratori gram negativi, patogeni gram positivi setticemici e batteri anaerobi, come riportato in tabella 1.

Tabella 1: pannelli di molecole testate e loro concentrazioni in funzione dei microrganismi isolati. HL (High Level)

Pannello	Eenterobatteri gram negativi	Patogeni respiratori gram negativi	Patogeni gram positivi setticemici
Antibiotic	i	Concentrazio	ne (μg/ml)
Aminosidina (paramomicina)	1-32		
Amoxicillina + acido clavulanico	025/012-32/16	0,06/0,03-16/8	025/012-16/8
Ampicillina	0,25-32	0,015-16	0,03-16
Bacitracina			
Cefazolina	0,5-8		0,25-8
Ceftiofur		0,06-8	0,25-8
Clindamicina			0,5-2
Colistina	0,03-8		
Doxiciclina			
Enrofloxacin	0,015-32	0,03-2	0,25-4
Eritromicina			0,03-8
Florfenicolo	1-64	0,25-8	2-8
Flumequina	1-16		
Gentamicina	0,25-32		
Kanamicina +HL	2-32		8-32 + 250-500
Lincomincina			
Oxacillina			0,25-4
Penicillina			0,03-16
Rifampicina			0,06-2
Sulfisoxazolo	128-512		128-512
Spectinomicina		4-128	
Tetraciclina	0,5-16	0,12-16	0,25-16
Tiamulina		8-32	
Tilmicosina		0,25-64	8-32
Tildipirosina		2-16	
Tilosina			
Trimetoprim + sulfonamidi	0,06/1,19-16/304		0,12/2,38-8/152
Tulatromicina		16-128	
Valnemulina			

Ai valori di MIC registrati sono stati attribuiti, dove possibile, il giudizio di Sensibile (S), Intermedio (I) e Resistente (R), secondo i *breakpoint* ricavati in letteratura nel suino per le diverse associazioni agente eziologico/molecola (CASFM 2014; CASFM 2020; CLSI M100; CLSI VET06; CLSI VET08; EUCAST,). Laddove non presenti in letteratura i valori di *breakpoint*, il giudizio viene emesso come "non Valutabile (V)".

RISULTATI

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP)

Complessivamente sono stati valutati 199 isolati riferibili a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, di cui 80,9% isolati da polmone e 12,6% da visceri non specificati in fase di consegna del

campione. I biotipi isolati erano riferiti a APP biotipo 1 in 101 campioni e biotipo 2 in 13 campioni provenienti da aziende differenti, negli altri casi il biotipo non era specificato. Complessivamente si osserva sensibilità di più del 90% degli isolati di APP testati per ceftiofur, gamitromicina, tiamulina, tildipirosina, tilmicosina, trimetoprim + sulfonamidi e tulatromicina (figura 1), mentre le resistenze maggiori, sopra il 20% di isolati resistenti, si registrano per amoxicillina con acido clavulanico, kanamicina e tetraciclina (figura 1). In riferimento al biotipo, si osserva come per il biotipo 2 si siano registrate maggiori resistenze verso amoxicillina con acido clavulanico, ampicillina e tetraciclina rispetto al biotipo 1 (figura 2). In tabella 2a e 2 b sono riportati i dati relativi a tutti gli antibiotici per gli isolati di APP suddivisi anche in funzione del biotipo.

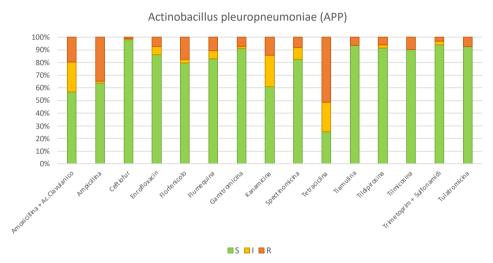


Figura 1: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di Actinobacillus pleuropneumoniae (APP). S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

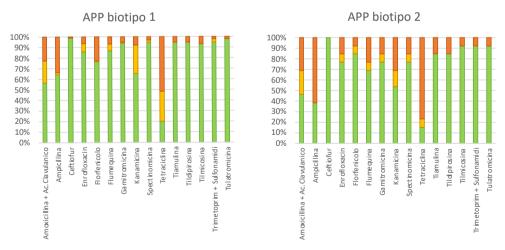


Figura 2: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) biotipo 1 e 2. S: sensibile in verde; I: intermedio in giallo, R: resistente in rosso.

Tabella 2a: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP).

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	56.8	23.6	19.6	199
Ampicillina	63.8	1.5	34.7	199
Ceftiofur	98	1	1	199
Enrofloxacin	86.4	6.5	7	199
Florfenicolo	79.9	2.5	17.6	199
Flumequina	82.9	6.5	10.6	199
Gamitromicina	91	2	7	199
Kanamicina	61.1	24.7	14.1	198
Spectinomicina	82.4	9.5	8	199
Tetraciclina	25.6	23.1	51.3	199
Tiamulina	93.5	0	6.5	199
Tildipirosina	91.5	2.5	6	199
Tilmicosina	90.5	0	9.5	199
Trimetoprim + Sulfonamidi	93.9	3.1	3.1	163
Tulatromicina	93	0	7	199

Tabella 2b: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) biotipo 1 e 2.

A4:L:-4:	Sens	sibile	Inter	medio	Resistente		
Antibiotico	Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 1	Biotipo 2	
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	56.4	46.2	20.8	23.8	22.8	30.8	
Ampicillina	64.4	38.5	2	0	33.7	61.5	
Ceftiofur	99	100	0	0	1	00	
Enrofloxacin	86.1	76.9	7.9	7.7	5.9	15.4	
Florfenicolo	76.2	84.6	1	7.79	22.8	7.7	
Flumequina	87.1	69.2	5.9	7.7	6.9	23,8	
Gamitromicina	94.1	76.9	1	7.7	5	15.4	
Kanamicina	65.3	53.8	26.7	15.4	7.9	30.8	
Spectinomicina	95	76.9	2	7.7	3	15.4	
Tetraciclina	19.8	15.4	28.7	7.7	51.5	76.9	
Tiamulina	95	84.6	0	0	5	15.4	
Tildipirosina	95	84.6	0	0	5	15.4	
Tilmicosina	93.1	92.3	0	0	6.9	7.7	
Trimetoprim + Sulfonamidi	95	92.3	3	0	2	7.7	
Tulatromicina	98	92.3	0	0	2	7.7	

Streptococcus suis

Sono stati sottoposti a test di sensibilità 442 isolati riferibili a *Streptococcus suis*, provenienti da matrici differenti: carcassa (37,4%), polmone (26,5%), visceri non specificati (17,1%) e cervello (12%). L'identificazione del sierotipo tramite metodica molecolare di PCR che permette di identificare i sierotipi 1,2,7 e 9 (Silva *et al.*, 2006), quando richiesta (184 isolati), ha evidenziato la presenza di 9 isolati di sierotipo 1, 72 isolati di sierotipo 2, 21 isolati di sierotipo 7 e 82 isolati di sierotipo 9. L'analisi degli esiti delle MIC effettuate è riportata in tabella 3 e figura 3 per tutti gli isolati di *Streptococcus suis*, mentre gli esiti specifici rilevati nei diversi sierotipi sono riportati in tabella 4 (a-b-c-d) e figura 4 (a-b-c-d).

Tabella 3: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Streptococcus suis*.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	88	5.4	6.6	392
Ampicillina	94.3	3.4	2.3	440
Cefazolina	93.7	2.3	4.1	394
Ceftiofur	95.7	1.4	2.9	442
Clindamicina	12.2	58.9	28.9	394
Enrofloxacin	80.7	15	4.3	440
Eritromicina	18.1	0	81.9	393
Florfenicolo	92.7	3.4	3.9	440
Kanamicina	91.2	0	8.8	352
Kanamicina alta resistenza	78.3	0	21.7	83
Oxacillina	95.9	0	4.1	364
Penicillina	67.7	19.4	13	439
Rifampicina	85	11.7	3.3	393
Tetraciclina	1.1	2.5	96.4	442
Trimetoprim + Sulfonamidi	69.8	18.8	11.4	367

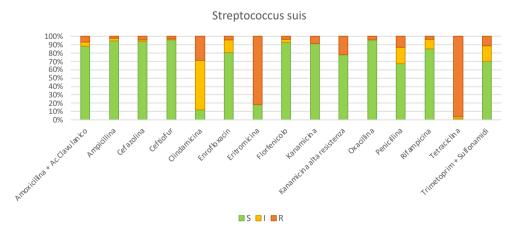


Figura 3: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di Streptococcus suis. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

Come riportato, la maggior parte degli isolati di *S. suis* risulta suscettibile alla penicillina (67,7%) e all'ampicillina (94,3%), mentre tetraciclina ed eritromicina mostrano i maggiori tassi di resistenza (rispettivamente 96,4% e 81,7%). L'elevata percentuale di isolati che hanno mostrato di essere sensibili a aumentate dosi di clindamicina (intermedi) sono da imputare ad un limite tecnico legato alla concentrazione massima di clindamicina in piastra (2 μ g/ml) che è pari al valore di *breakpoint* considerato come intermedio. Non potendo testare quindi concentrazioni aggiuntive, la maggior parte degli intermedi potrebbero essere ascritti alla categoria dei resistenti.

Tabella 4: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Streptococcus suis* in funzione del sierotipo testato (1,2,7,9).

Antibiotico		Sensibile				Intermedio			Resistente			
Sierotipo	1	2	7	9	1	2	7	9	1	2	7	9
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	100	98.6	90.5	84	0	0	0	7.4	0	1.4	9.5	8.6
Ampicillina	100	98.6	95	90.2	0	0	0	7.3	0	1.4	5.0	2.4
Cefazolina	100	100	90.5	91.5	0	0	4.8	3.7	0	0	4.8	4.9
Ceftiofur	100	97.2	95.2	96.3	0	0	0	1.2	0	2.8	4.8	2.4
Clindamicina	44.4	13.9	0	4.9	33.3	54.2	81	51.2	22.2	31.9	19.0	43.9
Enrofloxacin	100	88.9	95	89	0	11.1	5	7.3	0	0	0	3.7
Eritromicina	44.4	22.2	4.8	3.7	0	0	0	0	55.6	77.8	95.2	96.3
Florfenicolo	88.9	95.8	85.7	96.3	11.1	2.8	9.5	3.7	0	1.4	4.8	0
Kanamicina	100	93.1	95.2	90.2	0	0	0	0	0	6.9	4.8	9.8
Oxacillina	100	100	95.2	89.9	0	0	0	0	0	0	4.8	10.1
Penicillina	100	97.2	90	41.5	0	1.4	0	41.5	0	1.4	10	17.1
Rifampicina	77.8	87.5	90.5	80.5	22.2	12.5	4.8	14.6	0	0	4.8	4.9
Tetraciclina	0	0	0	0	0	1.4	0	2.4	100	98.6	100	97.6
Trimetoprim + Sulfonamidi	100	95.6	89.5	48.6	0	4.4	5.3	43.2	0	0	5.3	8.1

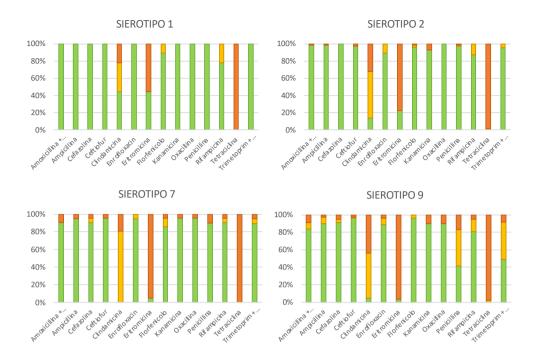


Figura 4: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di Streptococcus suis sierotipi 1,2,7 e 9. S: sensibile in verde; I: intermedio in giallo, R: resistente in rosso.

Dalla valutazione delle sensibilità di *S. suis* in funzione del sierotipo rilevato si nota come, per il sierotipo 9, si riduca sensibilmente la percentuale di isolati suscettibili alla penicillina (41,5% vs >90 % negli altri sierotipi), in misura minore anche per altri beta lattamici (ampicillina e amoxicillina in associazione ad acido clavulanico) (tabella 4 e figura 4). Differenze notevoli si osservano anche per l'associazione trimetorpim potenziata con sulfamidico (48,6% di suscettibili al sierotipo 9 vs > 80% per gli altri sierotipi) (tabella 4 e figura 4).

Pasteurella multocida

Gli isolati di *Pasteurella multocida* analizzati (n. 112) provenivano principalmente da polmone (48,2%), visceri non definiti (18,8%) e tamponi respiratori (17%). *Pasteurella multocida* mantiene buoni livelli di sensibilità per la maggior parte delle molecole testate, si nota ridotta sensibilità per tetraciclina (50,5%) e tiamulina (66,7%), come si nota in tabella 5 e figura 5.

Tabella 5: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di Pasteurella multocida.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Amoxicillina + Acido clavulanico	87.39	5.41	7.21	111
Ampicillin 92.8	na	0.9	6.3	111
Ceftiofur	97.3	0	2.7	111
Enrofloxacin	97.3	0	2.7	110
Florfenicolo	97.3	0.9	1.8	111
Flumequina	96.4	1.8	1.8	112
Gamitromicina	96.4	0.9	2.7	112
Kanamicina	85.7	5.4	8.9	112
Spectinomicina	82.1	4.5	13.4	112
Tetraciclina	50.5	6.3	43.2	111
Tiamulina	66.7	0	33.3	111
Tildipirosina	92.9	0	7.1	112
Tilmicosina	92.7	0	7.3	110
Trimetoprim + Sulfonamidi	82	6.3	11.7	111
Tulatromicina	95.5	1.8	2.7	112

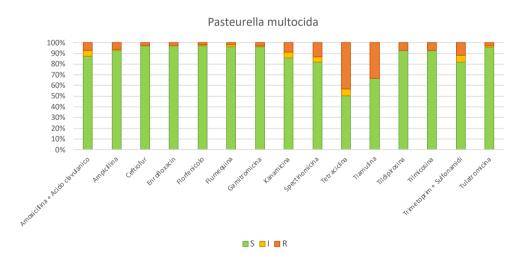


Figura 5: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Pasteurella multocida*. S: sensibile in verde; I: intermedio in giallo, R: resistente in rosso. *Escherichia coli*

Complessivamente sono stati testati 2244 isolati di *Escherichia coli* provenienti prevalentemente da carcasse (30,7%), feci (28,6%) intestino (17,5%) o tampone rettale (5,5%), oppure isolati da visceri (6%). Gli isolati testati hanno mostrato elevato grado di resistenza ad ampicillina (88%), sulfisoxazolo (81,5%) e tetraciclina (81,3%), come si vede in Tabella 6 e Figura 6. Alcuni isolati sono stati sottoposti a ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità per *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC) tramite multiplex *Polimerase Chain Reaction* (PCR) per geni codificanti le adesine F4 (k88), F5 (k99), F6 (987p) e F18 e le tossine LT I, STaP, STb e Stx2e, utilizzando i *primers* riportati da Casey & Bosworth (2009). Viene inteso come ETEC un isolato in grado di codificare per un'adesina e una tossina contemporaneamente. Tra gli isolati testati, 527 sono stati identificati come ETEC, di cui 313 con fimbria (F) F18 e 175 F4. I risultati dei test di sensibilità sono stati messi in relazione anche con i risultati della ricerca di geni ETEC, come si nota in Tabella 7 e Figura 7.

Tabella 6: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli*.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Aminosidina	60.7	2.2	37.1	2231
Amoxicillina + Acido clavulanico	63.1	21.6	15.3	2239
Ampicillina	11.9	0.1	88	2236
Cefazolina	21.6	32.4	46	2243
Cefotaxime	82	0	18	2238
Colistina	90.5	0	9.5	2238
Enrofloxacin	49.4	25.3	25.4	2239
Florfenicolo	21.4	18.9	59.7	2239
Flumequina	55.8	14.1	30	2244
Gentamicina	49	3.4	47.6	2241
Kanamicina	58.2	4.1	37.7	2242
Sulfisoxazolo	18.5	0	81.5	2231
Tetraciclina	17.6	1.1	81.3	2242
Trimetoprim + Sulfonamidi	33.5	0	66.5	2241

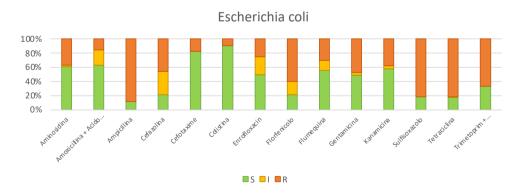


FIGURA6: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli*. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

TABELLA 7: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli* in funzione della presenza di geni codificanti per fattori di patogenicità ETEC.

Antibiotico	Sensibile			Iı	Intermedio			Resistente		
	ETEC	F18	F4	ETEC	F18	F4	ETEC	F18	F4	
Aminosidina	42.4	41.5	43.9	3.1	3.2	2.3	54.5	55.3	53.8	
Amoxicillina + Acido clavulanico	52	54.5	47.7	25.9	25	25.9	22.1	20.5	26.4	
Ampicillina	5.3	4.8	4.6	0.2	0.3	0	94.5	94.9	95.4	
Cefazolina	16.9	19.5	13.2	24.9	24.9	24.7	58.2	55.6	62.1	
Cefotaxime	73.3	75.7	71.7	0	0	0	26.7	24.3	28.3	
Colistina	86.1	86.9	85.1	0	0	0	13.9	13.1	14.9	
Enrofloxacin	35.4	40.9	26.4	32.7	36.7	26.4	31.9	22.4	47.1	
Florfenicolo	12	13.5	9.8	11.8	5.8	20.1	76.1	80.8	70.1	
Flumequina	39	38.8	39.4	23	30.4	14.3	38	30.8	46.3	
Gentamicina	22.8	16.3	29.9	5.1	7.7	1.7	71.9	76	68.4	
Kanamicina	38.7	39	37.1	5.5	5.8	5.7	55.8	55.3	57.1	
Sulfisoxazolo	12.2	9.9	15.9	0	0	0	87.8	90.1	84.1	
Tetraciclina	11.2	12.5	10.4	1.1	1.9	0	87.6	85.6	89.6	
Trimetoprim + Sulfonamidi	25.4	21.6	29.7	0	0	0	74.6	78.4	70.3	

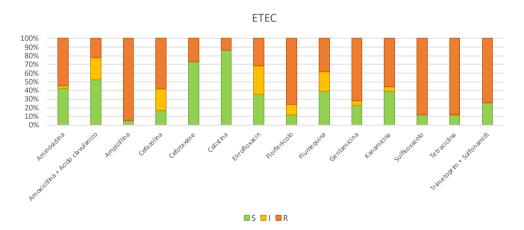


FIGURA 7a: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli enterotossigeni (ETEC)*. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

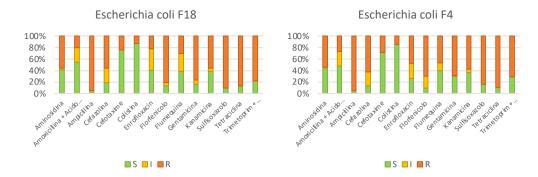


FIGURA 7b: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Escherichia coli* F18 e F4. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

Salmonella

È stata valutata la sensibilità di 81 isolati di *Salmonella* spp. . Sono emersi elevati livelli di resistenza nei confronti di ampicillina (85,2%), enrofloxacin (84%), sulfisoxazolo (86,8%) e tetraciclina (74,1%) (Tabella e figura 8). Al contrario, le maggiori sensibilità sono state registrate per aminosidina (90,1%), amoxicillina protetta con acido clavulanico (80,2) e colistina (98,8%). La sierotipizzazione degli isolati di *Salmonella* ha permesso di identificare 63 isolati di *Salmonella* choleraesuis e 5 isolati di *Salmonella* typhimurium variante monofasica, i cui risultati di sensibilità alle molecole testate sono riportati in tabella e figura 9.

TABELLA 8: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella*.

Antibiotico	Sensibile	Intermedio	Resistente	Totale isolati
Aminosidina	90.1	1.2	8.6	81
Amoxicillina + Acido clavulanico	80.2	16	3.7	81
Ampicillina	13.8	0	86.3	80
Cefotaxime	95.1	0	4.9	81
Colistina	98.8	0	1.2	81
Enrofloxacin	16	0	84	81
Florfenicolo	35.8	4.9	59.3	81
Flumequina	46.9	14.8	38.3	81
Sulfisoxazolo	13.2	0	86.8	76
Tetraciclina	24.7	1.2	74.1	81
Trimetoprim + Sulfonamidi	44.7	0	55.3	76

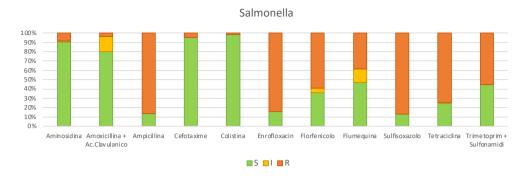


FIGURA 8: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella*. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

TABELLA 9: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella* choleraesuis (SC) e typhimurium variante monofasica (STM).

A4'hiatiaa	Sensibile		Inter	medio	Resistente	
Antibiotico	SC	STM	SC	STM	SC	STM
Aminosidina	93.7	60	1.6	0	4.8	40
Amoxicillina + Acido clavulanico	84.1	40	15.9	20	0	40
Ampicillina	12.9	0	0	0	87.1	100
Cefotaxime	96.8	100	0	0	3.2	0
Colistina	98.4	100	0	0	1.6	0
Enrofloxacin	12.7	60	0	0	87.3	40
Florfenicolo	36.5	20	3.2	20	60.3	60
Flumequina	44.4	60	17.5	0	38.1	40
Sulfisoxazolo	13.1	0	0	0	86.9	100
Tetraciclina	25.4	0	0	0	74.6	100
Trimetoprim + Sulfonamidi	45.9	40	0	0	54.1	60

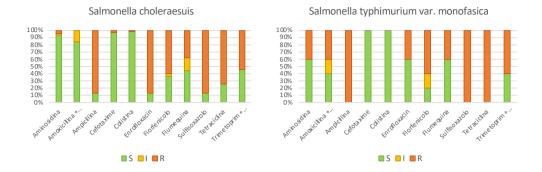


FIGURA 9: risultati (%) dei test di sensibilità eseguiti su isolati di *Salmonella* choleraesuis e typhimurium variante monofasica. S: sensibile; I: intermedio, R: resistente.

Come si può notare dai risultati riportati in tabella 9 e figura 9, la sensibilità degli isolati di *S.* choleraesuis è maggiore per le molecole aminosidina (93,7% vs6+0%) e amoxicillina associata ad acido clavulanico (84,1% vs 40%) rispetto a *S.* typhimurium var. monofasica, che invece si mostra più sensibile a flumequina (60% vs 44,4%) e enrofloxacin (60% vs 12,7%).

BIBLIOGRAFIA

- 1. Casey T.A., Bosworth B.T. (2009) "Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine". J Vet Diagn Invest. 21(1):25-30.
- 2. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) Reccomandations 2014
- 3. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) Reccomandations Vétérinaires 2020
- CLSI_M100, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing, 29th Edition. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2019.
- 5. CLSI_VET_06, Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious Bacteria Isolated From Animals, 1st Edition. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2017.
- CLSI_VET_08, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility
 Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition. Clinical and Laboratory Standards
 Institute 2018.
- 7. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2021.
- 8. Silva L.M.G., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., Valentin-Weigand P (2006) "Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR". Vet Microbiol 115(1-3):117-127.

IMPATTO DELLA BIOSICUREZZA SULLA SALUTE DEL SUINO E SULLA RIDUZIONE DEI TRATTAMENTI ANTIBIOTICI NELLA PRODUZIONE SUINICOLA

ELISE BERNAERDT1*; JEROEN DEWULF2; DOMINIEK MAES1

¹ Unit of Porcine Health Management, Department of Internal medicine, Reproduction and Population medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

² Veterinary Epidemiology Unit, Department of Internal medicine, Reproduction and Population medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

* Corresponding author: elise.bernaerdt@ugent.be

INTRODUZIONE

Nella produzione suinicola, gli antibiotici possono essere utilizzati in diversi modi. I trattamenti antibiotici terapeutici, o curativi vengono somministrati ad animali malati, preferibilmente dopo la diagnosi di infezione batterica. La somministrazione metafilattica, si riferisce invece alla somministrazione di antibiotici a un gruppo di animali dopo la diagnosi di infezione e/o malattia clinica in una parte di un gruppo per prevenire la diffusione dell'infezione agli animali a stretto contatto. La somministrazione profilattica, o preventiva è invece la somministrazione di antibiotici a un animale o a un gruppo di animali senza la presenza di segni clinici per prevenire l'insorgenza della malattia, ad esempio in periodi di stress come lo svezzamento (Aarestrup, 2005). La somministrazione profilattica di antimicrobici è considerata utilizzo non prudente del farmaco. Inoltre, nel dicembre 2018 è stato annunciato il nuovo regolamento UE sul farmaco veterinario, entrato in vigore nel gennaio 2022.

Uno degli obiettivi principali di questo nuovo regolamento è quello di rafforzare la risposta dell'UE nel combattere l'antibiotico resistenza, ed è stato stabilito che l'uso profilattico degli antibiotici dovrebbe essere applicato solo in casi eccezionali, per la somministrazione su singoli animali, quando il rischio di infezione è molto elevato e le conseguenze potrebbero essere gravi. Inoltre, il veterinario dovrebbe essere in grado di giustificare la prescrizione di antibiotici, specialmente in caso di uso metafilattico e profilattico. Questo nuovo regolamento vieta l'uso profilattico di antimicrobici in gruppi di animali (European Council Regulation, 2018).

Il progetto European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC), avviato dall'Agenzia europea per i medicinali (EMA), raccoglie dati sugli antimicrobici in medicina veterinaria nell'Unione europea. La partecipazione al progetto è volontaria e nel primo rapporto del 2010 hanno partecipato solo 19 paesi europei, mentre nel rapporto più recente del 2021 i paesi partecipanti erano 31 (Figura 1).

Venticinque paesi hanno fornito dati in modo continuativo sulle vendite tra il 2011 e il 2021 e le loro vendite sono state ridotte del 47 % nello stesso periodo (EMA, 2022). Una diminuzione maggiore dell'uso di antibiotici (AMU) si osserva soprattutto nei paesi con un consumo elevato. Per i paesi in cui erano già poco utilizzati, ad esempio i paesi scandinavi, è più difficile ridurre ulteriormente l'AMU.



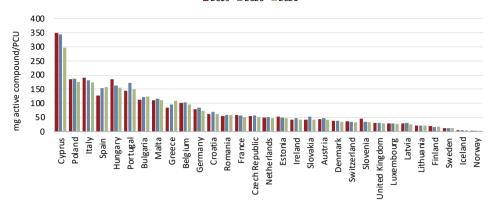


Figura 1. Panoramica delle vendite totali di antibiotici veterinari per animali destinati alla produzione di alimenti, in 31 paesi europei espresse in mg di principio attivo per PCU (unità di correzione della popolazione) dal 2019 al 2021 (adattato da European Medicines Agency (EMA), 2022)

Uso degli antibiotici nella produzione suinicola

Gli antibiotici possono essere somministrati per via parenterale, cioè tramite iniezione, o per via orale, cioè nei mangimi o nell'acqua potabile. La via parenterale è utilizzata principalmente per il trattamento di singoli animali, mentre la via orale è utilizzata per il trattamento di interi gruppi di animali. In alcuni studi il trattamento orale era quello più comune (Callens et al., 2012; Chauvin et al., 2002; Sarrazin et al., 2019; Sjölund et al., 2016), mentre in altri il trattamento parenterale era prevalente (Sjölund et al., 2015).

Esiste un'associazione tra l'AMU e la fase di produzione suina. Gli antibiotici vengono più comunemente usati nei suini più giovani e specialmente nei suini in svezzamento (Callens et al., 2012; Sarrazin et al., 2019; Sjölund et al., 2016). Inoltre, ci sono diversi momenti di picco di utilizzo, in cui l'AMU aumenta, e questi picchi si riferiscono probabilmente ad alcuni periodi di stress nella vita di un maiale: nascita e castrazione (settimana 1), svezzamento (settimana 4) e inizio della fase di ingrasso (settimana 9) (Figura 2) (Sarrazin et al., 2019). I dati suggeriscono che la somministrazione strategica (profilattica) di antimicrobici a interi gruppi di animali sia una pratica comune. (Sjölund et al., 2016).

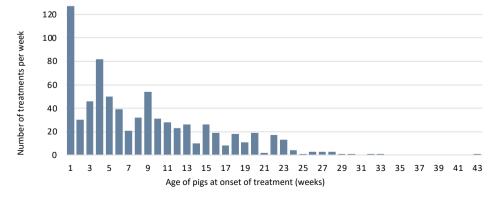


Figura 2.Numero di trattamenti antimicrobici di gruppo a settimana applicati a un lotto di suini dalla nascita alla macellazione (adattato da Sarrazin et al., 2019)

Ci sono varie ragioni per trattare i suini con antibiotici: infezioni gastrointestinali, respiratorie o generali (Jensen et al., 2012; Sarrazin et al., 2019). Ma spesso, l'indicazione più comune per il trattamento dipende dall'età del maiale. I suini da riproduzione e da ingrasso sono trattati principalmente contro le infezioni gastrointestinali, mentre le scrofe e i suinetti sottoscrofa sono più spesso trattati contro infezioni articolari e cutanee, e infezioni del sistema nervoso (Jensen et al., 2012).

Diversi studi hanno identificato i fattori di rischio per l'AMU. Questi fattori di rischio possono essere suddivisi in quattro gruppi principali, vale a dire: 1) caratteristiche dell'allevamento, 2) biosicurezza, 3) immunità e 4) fattori socio-economici (tabella 1).

Tabella 1. Panoramica dei fattori di rischio per l'AMU nella produzione suinicola

Tipi di fattori di rischio	Fattori di rischio	Bibliografia
Caratteristiche	Nessuna analisi dei parametri produttivi	Arnold et al. (2016) ^c , Hirsiger et al. (2015) ^b
dell'allevamento	Alto tasso di mortalità in ingrasso	Casal et al. (2007) a.c, O'Neill (2016) a
	Nessun applicazione di sostanze omeopatiche	Arnold et al. (2016) c
	Allevamenti grandi (scrofe)	Backhans et al. (2016) ^a , Van der Fels-Klerx et
	Allevamento piccolo (animali all'ingrasso)	al. (2011) ^{c,d}
	Visita del veterinario < 2 volte per anno	Hybschmann et al. (2011) a.c, Vieira et al. (2011) c
	Allevamento non Specific Pathogen Free	Hirsiger et al. (2015) ^b
	Tipo di allevamento	Hybschmann et al. (2011) a.c, Sjölund et al. (2015) a
		Casal et al. (2007) a,c, Hybschmann et al. (2011)
		a,c, Van der Fels-Klerx et al. (2011) c,d
Biosicurezza generale	Bassa biosicurezza generale	Laanen et al. (2013) ^a , Postma et al. (2016b) ^a
Biosicurezza esterna	Bassa biosicurezza esterna	Postma et al. (2016b) ^a
	I tecnici di allevamento lavoran in altri allevamenti	Arnold et al. (2016) ^c
	Distanza dall'allevamento più vicino < 500 metri	Arnold et al. (2016) ^c
	Area ad alta densità di suini	Hybschmann et al. (2011) a.c., Van der Fels-Klerx
	Nessuna calzatura specifica per I visitatori	et al. (2011) ^d
	Qualità bassa dell'acqua nelle sale parto	Arnold et al. (2016) ^c
		Hirsiger et al. (2015) ^b
Biosicurezza interna	Bassa biosicurezza interna	Laanen et al. (2013) ^a
	Nessuna flusso lavorativo di routine da animali sani a malati	Arnold et al. (2016)°
	Mescolare animali di diverse provenienze nello stesso box	Arnold et al. (2016)°
	Ingresso continuo di animali nei comparti	Hirsiger et al. (2015) ^b
Immunità	Suinetti svezzati	Callens et al. (2012) a, Postma et al. (2016b) a,
	Vaccinazione degli animali	Sjölund et al. (2016) a
		O'Neill (2016) a, Postma et al. (2016b) a, Stevens
		et al. (2007) a,c, Temtem et al. (2016) a
Fattori socio-economici	Aumento di età dell'allevatore	Backhans et al. (2016) a
	Allevatrici femmine	Backhans et al. (2016) ^a
	Elevata formazione dello staff tecnico	Backhans et al. (2016) ^a
	Veterinario	Hybschmann et al. (2011) a,c, (Speksnijder et al.,
		2015a), Speksnijder et al. (2015b)

Gli studi sono stati effettuati in tipi diversi di allevamento: a ciclo chiuso; b svezzamento; c ingrasso, d ciclo aperto

Ridurre l'uso di antibiotici nella produzione suinicola

Migliore gestione della salute e della biosicurezza

La biosicurezza dovrebbe essere la base di qualsiasi programma di controllo delle malattie (Figura 3). Se la biosicurezza è corretta, prevenire le malattie attraverso la vaccinazione o altri mezzi darà risultati migliori, il che significa che ci sarà meno bisogno di trattamenti curativi con antibiotici. Ci sono alcuni principi generali riguardanti la biosicurezza che si applicano a diverse specie animali (Dewulf & Van Immerseel, 2018):

- 1. Separazione di animali e ambienti ad alto e a basso rischio
- 2. Riduzione della pressione generale di infezione
- 3. Non tutte le vie di trasmissione hanno la stessa importanza
- 4. Il rischio è una combinazione di probabilità di trasmissione e frequenza del verificarsi delle diverse vie di trasmissione
- 5. Gruppi di animali più grandi presentano rischi più elevati.



Figura 3. La biosicurezza dovrebbe essere la base di qualsiasi programma di controllo delle malattie (Dewulf, 2018)

Le misure di biosicurezza in un allevamento mirano a limitare o addirittura prevenire completamente la trasmissione di agenti patogeni. Tutte le misure che mirano a ridurre il rischio di introduzione di agenti patogeni in un allevamento sono raggruppate sotto il nome di misure di biosicurezza esterna, mentre quelle che mirano a ridurre la diffusione di agenti patogeni all'interno di un allevamento sono definite come misure di biosicurezza interna (Figura 4). Per la produzione suinicola, ci sono sei categorie di biosicurezza esterna: 1) Acquisto di suini da riproduzione, suinetti e sperma; 2) Trasporto di animali, rimozione di carcasse e liquami; 3) Fornitura di mangimi, acqua e attrezzature; 4) Visitatori e personale dell'azienda; 5) Controllo dei parassiti e degli uccelli; e 6) Ubicazione dell'allevamento. Esistono poi che sei categorie di biosicurezza interna: 1) Gestione delle malattie; 2) Periodo di parto e allattamento; 3) Unità svezzamento; 4) Unità di ingrasso; 5) Misure tra compartimenti, flussi e utilizzo delle attrezzature; e 6) Pulizia e disinfezione (Dewulf et al., 2018).

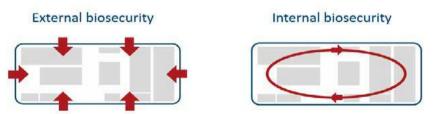


Figura 4. Rappresentazione grafica della biosicurezza esterna e interna (Dewulf, 2018)

Diversi studi hanno già dimostrato l'impatto positivo della biosicurezza sull'uso di antibiotici, senza compromettere i risultati di produzione. In uno studio sugli allevamenti di suini belgi dal parto alla macellazione, un punteggio di biosicurezza interna più elevato era correlato a una minore incidenza di trattamenti antibiotici, suggerendo che una migliore biosicurezza potrebbe aiutare a ridurre l'uso di antibiotici (Laanen et al., 2013). In uno studio sugli allevamenti francesi effettuato su tutto il ciclo, è stato osservato un uso inferiore di antibiotici nelle aziende con diverse misure di biosicurezza, come la disinfezione dell'area di carico, la guarantena e l'acclimatazione delle scrofette, la struttura dell'allevamento e i flussi, e l'applicazione del principio all-in/all-out (Lannou et al., 2012). In uno studio su quattro paesi europei, una maggiore biosicurezza esterna è stata significativamente associata a una minore incidenza di trattamento antibiotico (Postma et al., 2016a). Questo risultato è stato confermato in uno studio in cui il livello di biosicurezza interna era associato a un migliore controllo delle malattie infettive e a una minore necessità di trattamenti antibiotici (Collineau et al., 2017a). In Danimarca, nel 2010 è stato introdotto il "Yellow Card Scheme" per ridurre l'uso di antibiotici. È stato riportato che diverse misure di biosicurezza come il miglioramento delle procedure di pulizia e l'attenzione alla produzione all-in/all-out hanno contribuito a ridurre il consumo di antibiotici (Dupont et al., 2017). Uno studio condotto nei Paesi Bassi ha rilevato che una migliore biosicurezza, ad esempio la presenza di una barriera sanitaria e il controllo dei parassiti con ditta professionale, erano correlati a minori probabilità di avere Escherichia coli produttore di beta-lattamasi in azienda (Dohmen et al., 2017). Uno studio belga ha rilevato che un miglioramento dello stato di biosicurezza, combinato con la gestione corretta degli antibiotici ha contribuito a ridurre l'uso di antibiotici rispettivamente del 52% e del 32% per i suini dalla nascita alla macellazione e nelle scrofe (Postma et al., 2017). Una valutazione economica basata sui risultati di questo studio ha mostrato che è stato ottenuto un beneficio di € 2,67 per suino da ingrasso all'anno, dopo l'implementazione degli interventi di biosicurezza (Roio-Gimeno e Postma et al., 2016). Uno studio simile è stato condotto in quattro paesi europei. Nello studio, una riduzione dell'uso di antibiotici è stata ottenuta mediante interventi specifici per l'allevamento, compresa la biosicurezza, senza impatto negativo sui parametri di produzione. La variazione mediana dei profitti netti delle aziende è stata stimata a € 4,46 e € 1,23 per scrofa all'anno nelle aziende belghe e francesi, rispettivamente (Collineau et al., 2017b).

La certificazione Raised Without Antibiotics (RWA)

Raised Without Antibiotics (RWA) è un'etichetta di certificazione riconosciuta in alcuni paesi come la Danimarca e gli Stati Uniti. Tuttavia, i criteri specifici di inclusione e le caratteristiche degli allevamenti RWA non sono chiari e l'attuazione degli RWA in un gran numero di aziende con condizioni di gestione e stabulazione diverse è stata studiata solo in modo limitato. In uno studio belga di Bernaerdt et al. (2022), l'utilizzo di antibiotici di 28 allevamenti di suini è stato tracciato per un periodo di 35 mesi. Gli obiettivi dello studio erano valutare se fosse possibile ottenere e mantenere lo status di RWA e determinare le differenze tra RWA e allevamenti di suini convenzionali. Nello studio, RWA è stato definito come "nessun antibiotico dalla nascita fino alla macellazione". Ai suini che necessitavano di un trattamento antibiotico individuale è stata applicata una marca auricolare e sono stati esclusi dal programma RWA. I risultati dello studio hanno mostrato che 13 allevamenti su 28 stavano allevando con successo suini senza antibiotici dopo un periodo di coaching di un anno. Un anno dopo, ancora 12 su 13 stavano mantenendo questo status. Gli allevamenti RWA erano più piccoli (mediana 200 scrofe, range 85-300) rispetto agli allevamenti non-RWA (mediana 350 scrofe, range 180-1250). La banda 4 settimanale era utilizzata maggiormente nelle aziende non RWA, mentre i sistemi in banda 3 e 5 settimanale erano utilizzati più spesso

nelle aziende RWA. L'età di svezzamento era leggermente più alta (non significativamente) negli allevamenti RWA (media 24,9 giorni), rispetto agli allevamenti non RWA (media 23,9 giorni). Questo studio ha dimostrato che gli allevatori potrebbero raggiungere e mantenere lo stato RWA attraverso un coaching specifico per l'azienda relativo all'AMU prudente e al miglioramento della biosicurezza.

CONCLUSIONI

E'chiaro che l'uso di antimicrobici diminuirà ulteriormente e alla fine diventerà un atto eccezionale nel futuro allevamento suino. Ovviamente, per la maggior parte delle aziende, sia all'interno che all'esterno dell'Europa, questo richiederà ulteriori sforzi e si concretizzerà con allevamenti, biosicurezza e gestione migliori. In definitiva, questa riduzione comporterà anche il livellamento e, si spera, anche l'inversione della selezione della resistenza, portando a ulteriori benefici per la salute animale e umana, la sicurezza e la sanità alimentare a livello globale.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Aarestrup, F. M. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *96*(4), 271-281.
- 2. Arnold, C., Schüpbach-Regula, G., Hirsiger, P., Malik, J., Scheer, P., Sidler, X., Spring, P., Peter-Egli, J., & Harisberger, M. (2016). Risk factors for oral antimicrobial consumption in Swiss fattening pig farms—a case—control study. *Porcine health management*, *2*(1), 1-9.
- 3. Backhans, A., Sjölund, M., Lindberg, A., & Emanuelson, U. (2016). Antimicrobial use in Swedish farrow-to-finish pig herds is related to farmer characteristics. *Porcine health management*, 2(1), 1-7.
- 4. Bernaerdt, E., Maes, D., Van Limbergen, T., Postma, M., & Dewulf, J. (2022). Determining the characteristics of farms that raise pig without antibiotics. *Animals*, 12(10), 1224.
- 5. 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. *Preventive veterinary medicine*, 106(1), 53-62.
- 6. Casal, J., Mateu, E., Mejía, W., & Martín, M. (2007). Factors associated with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high pig-density area. *Veterinary research*, 38(3), 481-492.
- 7. 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.
- Collineau, L., Backhans, A., Dewulf, J., Emanuelson, U., groβe Beilage, E., Lehébel, A., Loesken, S., Okholm Nielsen, E., Postma, M., & Sjölund, M. (2017a). Profile of pig farms combining high performance and low antimicrobial usage within four European countries. *Veterinary Record*, 181(24), 657-657.
- 9. Collineau, L., Rojo-Gimeno, C., Léger, A., Backhans, A., Loesken, S., Nielsen, E. O., Postma, M., Emanuelson, U., groβe Beilage, E., & Sjölund, M. (2017b). Herd-specific interventions to reduce antimicrobial usage in pig production without jeopardising technical and economic performance. *Preventive veterinary medicine*, 144, 167-178.
- 10. Dewulf, J. (2018). 8 myths on antibiotic resistance disproved.
- 11. Dewulf, J., Postma, M., Vanbeselaere, B., Maes, D., & Filippitzi, M. E. (2018). Transmission of pig diseases and biosecurity in pig production. In J. Dewulf & F. Van Immerseel (Eds.), *Biosecurity in animal production and veterinary medicine* (1st ed., pp. 295-328). Leuven, Belgium, Acco.

- 12. Dewulf, J., & Van Immerseel, F. (2018). General principles of biosecurity in animal production and veterinary medicine. In J. Dewulf & F. Van Immerseel (Eds.), *Biosecurity in animal production and veterinary medicine* (1st ed., pp. 63-76). Leuven, Belgium, Acco.
- 13. Dohmen, W., Dorado-García, A., Bonten, M. J. M., Wagenaar, J. A., Mevius, D. J., & Heederik, D. J. J. (2017). Risk factors for ESBL-producing Escherichia coli on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PloS one*, *12*(3), e0174094.
- 14. Dupont, N., Diness, L. H., Fertner, M., Kristensen, C. S., & Stege, H. (2017). Antimicrobial reduction measures applied in Danish pig herds following the introduction of the "Yellow Card" antimicrobial scheme. *Preventive veterinary medicine*, 138, 9-16.
- 15. European Council Regulation. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on Veterinary Medicinal Products and repealing Directive 2001/82/EC. (2018).
- 16. European Medicines Agency (EMA). (2022). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021. Trends from 2010 to 2021. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2021-trends-2010-2021-twelfth-esvac en.pdf
- 17. Hirsiger, P., Malik, J., Kümmerlen, D., Vidondo, B., Arnold, C., Harisberger, M., Spring, P., & Sidler, X. (2015). Risikofaktoren für den oralen Einsatz von Antibiotika und Tierbehandlungsinzidenz bei Absetzferkeln in der Schweize. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 157(12), 682-688.
- 18. Hybschmann, G. K., Ersbøll, A. K., Vigre, H., Baadsgaard, N. P., & Houe, H. (2011). Herd-level risk factors for antimicrobial demanding gastrointestinal diseases in Danish herds with finisher pigs: a register-based study. *Preventive veterinary medicine*, *98*(2-3), 190-197.
- 19. 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.
- 20. Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D., & Dewulf, J. (2013). Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *The Veterinary Journal*, 198(2), 508-512.
- 21. Lannou, J., Hémonic, A., Delahaye, A. C., Guinaudeau, J., Corrégé, I., Morvan, R., Gueguen, F., Lewandowski, E., & Adam, M. (2012). *Antibiotiques en élevage porcin: modalités d'usage et relation avec les pratiques d'élevage*. Paper presented at the Congrès annuel de l'AFMVP, Maisons-Alfort.
- 22. O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Retrieved from https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper with%20cover.pdf
- 23. Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Groβe Beilage, E., Nielsen, E. O., & Stärk, K. D. C. (2016a). Evaluation of the relationship between the biosecurity status, production parameters, herd characteristics and antimicrobial usage in farrow-to-finish pig production in four EU countries. *Porcine health management*, 2(1), 1-11.
- 24. Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Groβe Beilage, E., Stärk, K. D. C., & Dewulf, J. (2016b). The biosecurity status and its associations with production and management characteristics in farrow-to-finish pig herds. *Animal*, *10*(3), 478-489.
- 25. Postma, M., Vanderhaeghen, W., Sarrazin, S., Maes, D., & Dewulf, J. (2017). Reducing

- antimicrobial usage in pig production without jeopardizing production parameters. *Zoonoses and public health*, 64(1), 63-74.
- 26. Rojo-Gimeno, C., Postma, M., Dewulf, J., Hogeveen, H., Lauwers, L., & Wauters, E. (2016). Farm-economic analysis of reducing antimicrobial use whilst adopting improved management strategies on farrow-to-finish pig farms. *Preventive veterinary medicine*, 129, 74-87.
- 27. Sarrazin, S., Joosten, P., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Mevius, D. J., Wagenaar, J. A., Heederik, D. J. J., & Dewulf, J. (2019). Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage patterns in 180 selected farrow-to-finish pig farms from nine European countries based on single batch and purchase data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(3), 807-816.
- 28. Sjölund, M., Backhans, A., Greko, C., Emanuelson, U., & Lindberg, A. (2015). Antimicrobial usage in 60 Swedish farrow-to-finish pig herds. *Preventive veterinary medicine*, 121(3-4), 257-264.
- 29. Sjölund, M., Postma, M., Collineau, L., Lösken, S., Backhans, A., Belloc, C., Emanuelson, U., Groβe Beilage, E., Stärk, K., & Dewulf, J. (2016). Quantitative and qualitative antimicrobial usage patterns in farrow-to-finish pig herds in Belgium, France, Germany and Sweden. *Preventive veterinary medicine*, *130*, 41-50.
- 30. Speksnijder, D. C., Jaarsma, D. A. C., Van Der Gugten, A. C., Verheij, T. J. M., & Wagenaar, J. A. (2015a). Determinants associated with veterinary antimicrobial prescribing in farm animals in the Netherlands: a qualitative study. *Zoonoses and public health*, 62, 39-51.
- 31. Speksnijder, D. C., Jaarsma, D. A. C., Verheij, T. J. M., & Wagenaar, J. A. (2015b). Attitudes and perceptions of Dutch veterinarians on their role in the reduction of antimicrobial use in farm animals. *Preventive veterinary medicine*, 121(3-4), 365-373.
- 32. Stevens, K. B., Gilbert, J., Strachan, W. D., Robertson, J., Johnston, A. M., & Pfeiffer, D. U. (2007). Characteristics of commercial pig farms in Great Britain and their use of antimicrobials. *Veterinary Record*, 161(2), 45-52.
- 33. Temtem, C., Kruse, A. B., Nielsen, L. R., Pedersen, K. S., & Alban, L. (2016). Comparison of the antimicrobial consumption in weaning pigs in Danish sow herds with different vaccine purchase patterns during 2013. *Porcine health management*, 2(1), 1-11.
- 34. Van der Fels-Klerx, H. J., Puister-Jansen, L. F., Van Asselt, E. D., & Burgers, S. L. G. E. (2011). Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production. *Journal of Animal Science*, 89(6), 1922-1929.
- 35. Vieira, A. R., Pires, S. M., Houe, H., & Emborg, H. D. (2011). Trends in slaughter pig production and antimicrobial consumption in Danish slaughter pig herds, 2002–2008. *Epidemiology & Infection*, 139(10), 1601-1609.

EPIDEMIOLOGIA ED EVOLUZIONE DI PCV-2: UN VECCHIO, NUOVO VIRUS

EPIDEMIOLOGY AND EVOLUTION OF PCV-2: AN OLD, NEW VIRUS

FRANZO GIOVANNI

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro (PD), 35020, Italia

Parole chiave: PCV-2; Epidemiologia; Evoluzione *Keywords*: PCV-2; Epidemiology; Evolution

RIASSUNTO

L'identificazione di Porcine circovirus 2 (PCV-2) risale ormai a diversi decenni fa e molti studi ne hanno dimostrato un'origine ben più antica. Nonostante ciò, l'aggettivo "emergente" è tuttora spesso associato a questo patogeno, non del tutto a torto. In virtù del suo elevato potenziale evolutivo, PCV-2 ha saputo "rinnovarsi" nel corso del tempo, ponendo sempre nuove sfide nella conoscenza della sua biologia ed epidemiologia, e quindi nel suo controllo. Il presente elaborato mira a riassumere brevemente le attuali conoscenze sulla variabilità virale e i determinanti che ne sono alla base. Caratteristiche proprie del virus e dei moderni sistemi di allevamento intensivo hanno infatti favorito negli anni l'alternarsi di diversi genotipi con caratteristiche biologiche in parte diverse. Questo, oltre a complicare la classificazione di PCV-2 e lo studio della sua epidemiologia, ha posto e continua a porre nuovi interrogativi sull'efficacia delle strategie di controllo, vaccinazione in primis. Sebbene i dati a nostra disposizione depongano a favore di una sostanziale protezione clinica indotta dai vaccini in uso, quando correttamente applicati, il quadro complessivo è probabilmente ben più complesso. Le grandi, dense e interconnesse popolazioni animali tipiche dell'allevamento intensivo possono sostenere parimenti enormi popolazioni virali sulle quali, in presenza di un'immunità non sterilizzante, le spinte evolutive indotte dall'immunità naturale e potenzialmente dalla stessa immunità vaccinale possono agire determinando un quadro in continuo divenire. A ciò si associa la presenza di diverse nicchie ecologiche scarsamente o per nulla studiate, che potrebbero albergare nuove varianti o favorirne l'evoluzione in direzioni non prevedibili. Si rende quindi necessario un continuo e più approfondito studio dell'epidemiologia di PCV-2, nonché lo sviluppo di strumenti di controllo sempre più efficaci e cross-protettivi, in grado di limitare non solo la comparsa di segni clinici ma la replicazione virale stessa, frenando così la corsa evolutiva di questo virus.

ABSTRACT

Porcine circovirus 2 (PCV-2) was identified several decades ago and different studies have revealed a far more ancient origin. Nevertheless, PCV-2 is still considered an "emerging" pathogen from various perspectives. Thanks to its remarkable evolutionary potential, PCV-2 was able to evolve over time, posing new challenges to the knowledge of its biology, epidemiology and thus to its control. The present work aims to briefly summarize the state of the art on PCV-2 heterogenicity and its determinants. Viral features and peculiarities of modern intensive pig farming have favoured the emergence of a number of genotypes with partially different characteristics. Besides complicating the PCV-2 classification and the

study of its epidemiology, such variability has risen questions on the efficacy of available control strategies, especially vaccination. Although current data support a substantial clinical protection conferred by available vaccines, at least when properly applied, the overall situation is likely much more complex. The huge, dense, and interconnected animal populations featuring intensive farming can maintain similarly big viral populations on which, because of the non-sterilizing immunity, selective forces caused by natural and likely vaccine-induced immunity can lead to a dynamic and ever-changing scenario. The presence of ecological niches that are poorly or not investigated and that might host new genetic variants or unpredictably enhance their evolution is a further menace for swine farming. The continuous and extensive monitoring of PCV-2 molecular epidemiology is, therefore, mandatory. Similarly pivotal will be the development of updated control measures, with a broader cross-protection and efficacy, devoted to the control not only of the clinical signs and productivity losses but of the viral replication also, thus slowing down the evolutionary race of this virus.

INTRODUZIONE

Gli ultimi decenni sono stati caratterizzati da un'enorme espansione nella conoscenza della diversità virale grazie allo sviluppo di metodiche diagnostiche e di caratterizzazione sempre più sensibili e accurate. Il genere Circovirus rappresenta un ottimo esempio in tal senso. Inizialmente composto da un limitato numero di specie essenzialmente di interesse aviare, attualmente l'ultimo report dell'International Committee on Taxonomy of Viruses comprende 49 specie di circovirus che affliggono animali di diverse classi e vi sono evidenze che la coesistenza perduri da milioni di anni. Frequentemente, il riscontro di questi agenti si è rivelato essere meramente accidentale in animali sani e, anche in presenza di sindromi cliniche, il nesso causale non è stato dimostrato nella maggior parte dei casi. Persino l'associazione con la specie ospite, in particolar modo quando l'identificazione è avvenuta a partire da materiale o tratti dell'apparato digerente, è problematica e incerta. Tuttavia, certi circovirus, fra cui alcuni di interesse suino, rappresentano una ragguardevole eccezione, considerando la grande rilevanza clinica e il loro impatto economico (Franzo and Segalés, 2020a). In particolare, quella sostenuta dalla specie Porcine circovirus 2 (PCV-2) è senza dubbio la circovirosi di maggior rilevanza e, più in generale, rappresenta una delle patologie infettive più importanti per l'allevamento suino. Identificato inizialmente in Nord America nella seconda metà degli anni 90 in animali affetti da deperimento sistemico, è stato rapidamente segnalato a livello mondiale in presenza di diverse forme cliniche quali PCV-2-systemic disease (PCV-2-SD) (precedentemente conosciuta come postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) e PCV-2-reproductive disease (PCV-2-RD), globalmente rinominate porcine circovirus diseases (PCVD) (Segalés, 2012; Segalés et al., 2013). Paradossalmente, anche l'infezione asintomatica (PCV-2-SI) viene annoverata fra le PCVD in quanto dannosa per la produttività degli animali. Si stima infatti che le forme asintomatiche siano economicamente più rilevati di quelle cliniche, al punto che la vaccinazione viene considerata vantaggiosa anche in allevamenti non afflitti da forme cliniche (Alarcon et al., 2013).

AGENTE EZIOLOGICO

Il Porcine circovirus 2 (PCV-2) è un virus sprovvisto di *envelope*, caratterizzato da un genoma circolare ambisenso a singolo filamento di DNA (ssDNA) di circa 1.7kb nel quale sono state identificate un numero limitato di Open Reading Frame (ORFs). Fra queste, quelle di maggior rilevanza sono senza dubbio l'ORF1, codificante tramite *splicing* alternativo per le proteine Rep e Rep', necessarie per la replicazione virale, e ORF2, codificante la

proteina Cap, unico componente del capside virale, fondamentale per l'adesione virale e sede dei principali determinanti antigenici. In aggiunta, la traduzione di ulteriori ORF è stata dimostrata (ORF3-6). Le rispettive proteine, pur non essenziali, sono implicate nella regolazione della replicazione virale e nella patogenesi, condizionando a vario titolo il ciclo e i processi cellulari, regolando l'apoptosi, interferendo con il signalling intra e intercellulare e con l'attivazione e lo sviluppo dell'immunità (Franzo and Segalés, 2020b). Similmente ad altri virus a ssDNA, PCV-2 si caratterizza per il grande potenziale evolutivo. ascrivibile sia ad un elevato tasso di mutazione che di ricombinazione (Franzo et al., 2016a). La fonte primaria di questa eterogeneità si genera a livello del singolo ospite. Lo studio della variabilità virale intra-ospite ha infatti evidenziato come a seguito dell'infezione, a partire da una sottopopolazione principale persistente nel tempo, si originino rapidamente molteplici varianti che "esplorano" diverse soluzioni evolutive. Sebbene la maggior parte di queste rappresentino dei fondi ciechi, alcune possono presentare delle caratteristiche che ne determinano una maggiore fitness e quindi la selezione all'interno dell'individuo e, in taluni casi, ne favoriscono la trasmissione nella popolazione (Correa-Fiz et al., 2018). Similmente, a seguito della coinfezione di un suino con più genotipi o ceppi, la genesi di ceppi ricombinanti è un fenomeno frequente e rapido (Correa-Fiz et al., 2018). Anche in questo caso, le nuove varianti possono presentare un vantaggio evolutivo e diffondersi su larga scala (Franzo et al., 2016a). È interessante sottolineare come non siano gli individui affetti da PCVD ad albergare la maggiore variabilità genetica entro ospite ma bensì gli animali che, pur in presenza di un'elevata carica virale, risultano asintomatici. Tale evidenza, sebbene controintuitiva, risponde perfettamente ai principi alla base della selezione naturale. Perché questa possa avvenire, si rendono necessarie sia grandi popolazioni virali, (i.e. alti titoli virali) sia forti pressioni selettive (come in questo caso, una risposta immunitaria efficiente, in grado di controllare la comparsa di segni clinici) (Correa-Fiz et al., 2020). Ne consegue che le strategie di controllo non possano mirare solamente alla riduzione/prevenzione delle forme cliniche, ma debbano perseguire la limitazione della replicazione e trasmissione virale. Solo seguendo tale principio è infatti possibile prevenire l'evoluzione virale e le minacce che questa comporta, non per il singolo animale o allevamento, ma per il sistema nel suo complesso.

Su scala epidemiologica, il potenziale evolutivo di PCV-2 ha portato all'emergere di una rimarchevole variabilità genetica e fenotipica. Al fine di agevolarne lo studio, sono stati fatti diversi tentativi di semplificare questo scenario, aggregando fra loro ceppi con caratteristiche genetiche simili. Tale processo è stato alla base di diverse problematiche legate sia alla difficoltà di definire criteri di classificazione e nomenclatura condivisi, sia alla necessità di aggiornarli al progredire dell'accumularsi di nuovi dati. A partire dai 2 genotipi inizialmente identificati, l'attuale classificazione riconosce 9 genotipi (PCV-2a/i) sulla base di criteri di distanza genetica e analisi filogenetica del gene ORF2 (Franzo and Segalés, 2018). Fra questi PCV-2a, -2b e -2d sono tradizionalmente considerati genotipi maggiori, in funzione della loro prevalenza a livello mondiale, mantenutasi elevata nel corso del tempo, sebbene con fluttuazioni (vd. prossimo capitolo). I restanti genotipi, definiti minori, vengono riscontrati più sporadicamente, in ristrette aree geografiche e per limitati periodi di tempo (Franzo and Segalés, 2018). Tuttavia, ad oggi, la conoscenza della loro epidemiologia è parziale e la comprensione della loro biologia e dinamiche lungi dall'essere compresa. Recenti studi stanno progressivamente gettando luce su queste tematiche, scardinando molte delle precedenti convinzioni e distinzioni, generando spesso più dubbi che risposte. Due genotipi apparentemente opposti nella loro storia risultano esemplificativi. PCV-2c, identificato inizialmente solamente in campioni di archivio risalenti agli anni 1980-90 (Dupont et al., 2008) è stato a lungo considerato estinto sino al 2015, quando è

stato nuovamente rilevato in pècari campionati nel 2010 nel Pantanal brasiliano (Franzo et al., 2015). Ancor più recentemente, uno studio condotto in Namibia nel 2019-2020 ne ha dimostrato la circolazione, peraltro con elevata frequenza, nei facoceri (Molini et al., 2021). Il riscontro di questo genotipo in aree del mondo e specie non sottoposte a diagnostica routinaria evidenzia come possano esistere nicchie ecologiche in grado di albergare varianti inattese e dal comportamento sconosciuto. Sebbene sia stato ipotizzato che i recenti ceppi di PCV-2c siano gli ultimi discendenti di una popolazione ancestrale, meno adattata alle condizioni del moderno allevamento suino, le reali ragioni per questa ristretta circolazione restano, ad oggi, ignote.

Similmente interessante è il caso di PCV-2e, attualmente il genotipo maggiormente divergente da un punto di vista genetico (Franzo and Segalés, 2018). Sebbene considerato un genotipo minore, è stato riscontrato in diversi stati con crescente frequenza, per quanto risulti difficile differenziare il reale aumento della prevalenza dall'effetto di una più intensiva attività diagnostica e di sequenziamento. PCV-2e non era mai stato riportato in Europa fino al 2022, quando è stato riscontrato incidentalmente in un allevamento italiano, in assenza di segni clinici ascrivibili ad un'eziologia infettiva e senza che fosse possibile identificare delle connessioni epidemiologiche con aree geografiche ove la circolazione fosse stata descritta (Franzo et al., 2022). Un ulteriore tassello è emerso nel corso di uno studio epidemiologico volto a comparare i ceppi circolanti in allevamenti italiani intensivi e rurali, durante il quale è stata dimostrata una significativa circolazione di PCV-2e solo in quest'ultimi. Anche in questo caso, si evidenzia come particolari genotipi o varianti possano circolare, non rilevati, in popolazioni normalmente trascurate dalla routinaria attività diagnostica e che ne hanno permesso il mantenimento nel lungo periodo. Sebbene la trasmissione di PCV-2e agli allevamenti intensivi sia risultata rara, frequenti ed efficaci contatti con animali allevati intensivamente sono stati dimostrati per altri genotipi. In funzione della divergenza genetica e fenotipica di PCV-2e e delle potenziali implicazioni che questa comporta in termini di cross-protezione, anche indotta dalla vaccinazione, deve risultare rafforzata la necessità di monitoraggi più intensivi anche di popolazioni animali la cui rilevanza economica può essere considerata marginale, in quanto possono avere un impatto indiretto molto rilevante se considerate come una minaccia per l'allevamento intensivo.

STORIA DI PCV-2

Diversi studi hanno provato a ricostruire la storia di PCV-2, in particolare dei suoi genotipi maggiori, nel corso del tempo. A dispetto di un'identificazione relativamente recente, sia studi retrospettivi che analisi basate sul così detto "orologio molecolare" hanno chiaramente evidenziato un'origine ben più antica, probabilmente vecchia di secoli e caratterizzata da una sostanziale convivenza fra il virus e il suo ospite (Jacobsen et al., 2009; Franzo et al., 2016a). A partire dagli anni '90, l'aumento della prevalenza di PCV-2, in particolare PCV-2a, e il suo emergere da infezione a vera e propria malattia, è con ogni probabilità da ascrivere in prima istanza all'intensificazione dell'allevamento. Infatti, le PCVD sono il tipico esempio di malattia multifattoriale, ove diversi fattori predisponenti devono essere presenti per l'esplicarsi della sintomatologia clinica. Le nuove condizioni e management degli animali avrebbero posto in essere una serie di condizioni favorenti sia una maggiore suscettibilità dell'animale che un incremento della pressione infettante. La selezione e diffusione di un numero limitato di razze suine è stata anche chiamata in causa (Segalés et al., 2013; Ellis, 2014). A questa prima fase, all'inizio del nuovo millennio, è seguito un periodo caratterizzato clinicamente dall'aumento nella frequenza e gravità degli outbreak di PCVD e dalla parallela espansione del genotipo PCV-2b, che ha largamente sostituito PCV-2a, un fenomeno ribattezzato primo genotype shift. Sebbene una reale associazione fra caratteristiche genetiche e virulenza sia ancora dibattuta, queste evidenze epidemiologiche suggeriscono che anche le caratteristiche del patogeno abbiano svolto e svolgano un ruolo di grande rilievo nel determinismo della malattia. Infine, un secondo *genotype shift* è stato osservato indicativamente a partire dal 2010, con l'emergere preponderante del genotipo PCV-2d, divenuto al momento quello a maggior prevalenza a livello mondiale (Franzo et al., 2016a). È suggestivo che tale espansione sia seguita all'introduzione e massiva applicazione della vaccinazione nei confronti di PCV-2. Tale evidenza, associata ad alcuni report di apparente insuccesso vaccinale in presenza di questo genotipo, ha suscitato il timore di una minor/scarsa protezione indotta dai vaccini attualmente in commercio nei confronti di questa variante (Xiao et al., 2012). Sebbene ad oggi non vi siano prove di una reale capacità dei nuovi ceppi di eludere la risposta dell'ospite con conseguenze cliniche e/o produttive rilevanti, evidenze di carattere epidemiologico potrebbero sostenere un effetto della vaccinazione nel condizionare l'evoluzione virale e favorire l'emergere di varianti caratterizzate da una fitness differenziale nel nuovo "ambiente vaccinale" (Karuppannan and Opriessnig, 2017; Franzo and Segalés, 2020b).

GENOTIPI, IMMUNITÀ E VACCINI

L'interazione fra PCV-2 e risposta immunitaria è complessa, coinvolge sia l'immunità umorale che cellulo-mediata, e rappresenta uno dei principali determinanti della patogenesi. Nonostante vari epitopi siano stati identificati in tutte le proteine virali, il Cap è il maggior target della risposta immunitaria, in particolare quella umorale, e contiene i principali epitopi neutralizzanti (Kekarainen and Segalés, 2015). Non a caso, i vaccini commercialmente disponibili sono basati su questa regione e hanno dimostrato una straordinaria efficacia, rivoluzionando il controllo dell'infezione. Allo stesso tempo, il capside è sottoposto ad intense pressioni selettive che ne giustificano l'eterogeneità fenotipica (Franzo et al., 2016a; Karuppannan and Opriessnig, 2017). Come precedentemente accennato, questa variabilità, associata a report aneddotici di episodi di PCVD in animali vaccinati, segnalati in presenza di PCV-2d, ha destato notevoli preoccupazioni circa l'emergere di così dette "escape variants" e la conseguente perdita di efficacia dei vaccini basati su PCV-2a. Diverse infezioni sperimentali sembrano sconfessare questa ipotesi, dimostrando piena cross-protezione, prevenzione delle lesioni e segni clinici, riduzione della viremia ed escrezione, indipendentemente dalla combinazione di genotipi usati come vaccino/challenge (Segalés, 2015; Franzo and Segalés, 2020b). La comparsa di segni clinici sarebbe quindi legata a un fallimento della vaccinazione piuttosto che del vaccino. Più recentemente, uno studio appositamente disegnato ha rilevato come la probabilità di isolare un particolare genotipo in apparenti insuccessi vaccinali rifletta essenzialmente la prevalenza complessiva dei genotipi a livello locale nel periodo di tempo considerato (Sibila et al., 2021). Una disamina più approfondita potrebbe però far trasparire un quadro più complesso e, per certi versi, più sfumato. Sebbene i sieri policionali siano effettivamente cross-reattivi fra genotipi diversi, lo stesso non si può affermare nel caso di anticorpi monoclonali, alcuni dei quali sono specifici per singoli genotipi o addirittura per particolari varianti (Saha et al., 2012). Similmente, anche in studi sperimentali è stata talvolta evidenziata, pur in presenza di una piena protezione clinica, una più elevata viremia o escrezione virale in animali vaccinati con un ceppo eterologo rispetto al challenge (Karuppannan and Opriessnig, 2017), I vaccini attualmente disponibili si sono rilevati efficaci anche nel limitare la trasmissione virale e quindi la prevalenza complessiva dell'infezione a livello mondiale (Dyorak et al., 2016). Tuttavia, in termini relativi, la diminuzione di PCV-2a è risultata molto più marcata rispetto a quella di PCV-2b ed in particolare di PCV-2d (Shen et al., 2012; Reiner et al., 2015; Franzo et al., 2016a). Anche in questo caso, una lieve protezione differenziale potrebbe esser implicata. Infine, analisi incentrate sullo studio dell'intensità delle forze selettive hanno evidenziato

una maggior pressione evolutiva, nonché la selezione di particolari sottogruppi virali, dopo l'introduzione della vaccinazione (Franzo et al., 2016b). L'insieme di queste evidenze permette di supporre che effettivamente vi possano essere delle differenze fra ceppi nell'efficacia dell'immunità indotta dai vaccini che, sebbene non necessariamente rilevante per il singolo individuo, condizionino lo scenario epidemiologico complessivo. I vaccini per PCV-2 sono infatti leaky vaccines, ossia in grado di conferire protezione clinica, ma non di prevenire l'infezione e la trasmissione virale. Qualora l'animale sia correttamente vaccinato. l'immunità indotta nei confronti di epitopi condivisi risulta con ogni probabilità sufficiente a garantire una piena protezione. Condizioni di vaccinazione sub-ottimali (e.g. errato *timing*, animali stressati, immunosoppressione, co-infezioni, ecc.) potrebbero viceversa esporre maggiormente al rischio di malattia animali infettatisi con ceppi eterologhi rispetto al vaccino. In aggiunta, una vaccinazione sub-ottimale, anche nel caso non esiti nella comparsa di segni clinici, potrebbe favorire la prolungata circolazione virale in un "ambiente vaccinale", favorendo quindi l'adattamento e la differenziazione dei ceppi di campo rispetto a quelli tradizionalmente usati nei vaccini. Si verrebbe infatti a generare lo scenario sopra menzionato, caratterizzato da grandi popolazioni virali in presenza di elevate pressioni selettive, indotte dall'immunità vaccinale. Conseguentemente, sebbene la corretta gestione della vaccinazione rimanga il principale obiettivo da perseguire, sarà utile cercare di monitorare l'evoluzione di PCV-2, poiché non è da escludere che nel tempo possano emergere varianti o genotipi effettivamente in grado di evadere efficacemente l'immunità vaccinale (Franzo and Segalés, 2020b). In tal senso, lo sviluppo di vaccini e protocolli che offrano un'ampia cross-protezione e limitino quanto più possibile la replicazione virale, oltre che la sintomatologia, potrebbe rappresentare una valida assicurazione nella prevenzione di questi fenomeni evolutivi (Franzo et al., 2019).

CONCLUSIONI

Nonostante PCV-2 sia con ogni probabilità un virus estremamente antico e le nostre conoscenze risalgano ormai a diversi decenni fa, le sfide che continua a porci sono molteplici e sono in larga parte da ascriversi al suo grande potenziale evolutivo. Questo, combinato alle caratteristiche del moderno allevamento intensivo e ai sistemi di controllo applicati, espone continuamente alla comparsa di nuove varianti maggiormente adattate alle condizioni della moderna suinicoltura e quindi più difficili da controllare. Similmente si è potuto osservare come diverse nicchie ecologiche, dagli allevamenti rurali alle specie selvatiche, possano albergare genotipi e varianti dal comportamento scarsamente prevedibile e che potrebbero rappresentare una futura minaccia anche per l'allevamento intensivo. A fronte di queste minacce, le armi a nostra disposizione sono molteplici ed efficaci. La rigorosa applicazione dei protocolli di biosicurezza e vaccinazione già disponibili è sicuramente prioritaria in quanto, oltre a prevenire/contenere le perdite produttive nell'immediato, limita le dimensioni della popolazione di PCV-2 e rappresenta un efficace ostacolo all'evoluzione virale. Lo sviluppo e l'applicazione di nuovi vaccini che garantiscano una maggior protezione nei confronti di multipli genotipi potrebbe ulteriormente contribuire a prevenire la replicazione virale anche in condizioni di vaccinazione sub-ottimale. Infine, non può essere trascurata l'importanza di un continuo monitoraggio dell'epidemiologia molecolare di PCV-2, non limitandosi meramente ai contesti intesivi e/o clinici, ma investendo risorse anche nello studio della circolazione virale in animali subclinici e in altre popolazioni non convenzionali che potrebbero albergare varianti inattese, la cui conoscenza rappresenta un imprescindibile strumento per non risultare impreparati rispetto alle sfide future che questo virus continuerà a presentare.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B., 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England An economic disease model. Prev Vet Med 110, 88–102. doi:10.1016/J.PREVETMED.2013.02.010
- Correa-Fiz, F., Franzo, G., Llorens, A., Huerta, E., Sibila, M., Kekarainen, T., Segalés, J., 2020. Porcine circovirus 2 (PCV2) population study in experimentally infected pigs developing PCV2-systemic disease or a subclinical infection. Sci Rep 10. doi:10.1038/ s41598-020-74627-3
- 3. Correa-Fiz, F., Franzo, G., Llorens, A., Segalés, J., Kekarainen, T., 2018. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genetic variability under natural infection scenario reveals a complex network of viral quasispecies. Sci Rep 8, 15469. doi:10.1038/s41598-018-33849-2
- 4. Dupont, K., Nielsen, E.O., Bækbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet Microbiol 128, 56–64. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.016
- 5. Dvorak, C.M.T., Yang, Y., Haley, C., Sharma, N., Murtaugh, M.P., 2016. National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. Vet Microbiol 189, 86–90. doi:10.1016/j.vetmic.2016.05.002
- Ellis, J., 2014. Porcine Circovirus: A Historical Perspective. Vet Pathol 51, 315–327. doi:10.1177/0300985814521245
- Franzo, G., Cortey, M., Castro, A.M.M.G. de, Piovezan, U., Szabo, M.P.J., Drigo, M., Segalés, J., Richtzenhain, L.J., 2015. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. Vet Microbiol 178, 158–162. doi:10.1016/j. vetmic.2015.05.003
- 8. Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M., 2016a. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. Mol Phylogenet Evol 100, 269–280. doi:10.1016/j. ympev.2016.04.028
- 9. Franzo, G., Legnardi, M., Tucciarone, C.M., Drigo, M., Martini, M., Cecchinato, M., 2019. Evolution of infectious bronchitis virus in the field after homologous vaccination introduction. Vet Res 50. doi:10.1186/s13567-019-0713-4
- Franzo, G., Segalés, J., 2020a. Circoviruses (Circoviridae), in: Bamford, D.H., Zuckerman, M. (Eds.), Encyclopedia of Virology. Elsevier Science, pp. 182–192.
- 11. Franzo, G., Segalés, J., 2020b. Porcine circovirus 2 genotypes, immunity and vaccines: Multiple genotypes but one single serotype. Pathogens 9, 1–12. doi:10.3390/pathogens9121049
- 12. Franzo, G., Segalés, J., 2018. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. PLoS One 13, e0208585. doi:10.1371/journal.pone.0208585
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2016b. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. Sci Rep 6, 39458. doi:10.1038/srep39458
- Franzo, G., Ustulin, M., Zanardelli, P., Castellan, A., Villa, N., Manfredda, A., Vio, D., Drigo, M., 2022. First detection of porcine circovirus type 2e in Europe. Veterinary Journal 279. doi:10.1016/j.tvjl.2022.105787
- Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segalés, J., Baumgaertner, W., 2009. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. Vet Microbiol 138, 27–33. doi:10.1016/j. vetmic.2009.02.005

- 16. Karuppannan, A.K., Opriessnig, T., 2017. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. Viruses 9, 99. doi:10.3390/v9050099
- 17. Kekarainen, T., Segalés, J., 2015. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. Porcine Health Manag 1, 17. doi:10.1186/s40813-015-0012-z
- 18. Molini, U., Franzo, G., Gous, L., Moller, S., Hemberger, Y.M., Chiwome, B., Marruchella, G., Khaiseb, S., Cattoli, G., Dundon, W.G., 2021. Three different genotypes of porcine circovirus 2 (PCV-2) identified in pigs and warthogs in Namibia. Arch Virol 166, 1723–1728. doi:10.1007/s00705-021-05035-9
- 19. Reiner, G., Hofmeister, R., Willems, H., 2015. Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. Vet Microbiol 180, 41–48. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.026
- 20. Saha, D., Huang, L., Bussalleu, E., Lefebvre, D.J., Fort, M., van Doorsselaere, J., Nauwynck, H.J., 2012. Antigenic subtyping and epitopes' competition analysis of porcine circovirus type 2 using monoclonal antibodies. Vet Microbiol 157, 13–22. doi:10.1016/j. vetmic.2011.11.030
- Segalés, J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. Expert Rev Vaccines 14, 473–487. doi:10.1586/14760584.2015.9830 84
- 22. Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res 164, 10–19. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.007
- 23. Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M., 2013. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? Vet Microbiol 165, 13–20. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.033
- Shen, H.G., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. Journal of General Virology 93, 1345–1355. doi:10.1099/ vir.0.039552-0
- 25. Sibila, M., Rocco, C., Franzo, G., Huerta, E., Domingo, M., Núñez, J.I., Segalés, J., 2021. Genotyping of porcine circovirus 2 (Pcv-2) in vaccinated pigs suffering from pcv-2-systemic disease between 2009 and 2020 in spain. Pathogens 10. doi:10.3390/pathogens10081016
- Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 2b Variant Present in Cases of Vaccine Failures in the United States. J Virol 86, 12469–12469. doi:10.1128/JVI.02345-12

FORTE IMPATTO DEL BACKGROUND GENETICO DI VIRUS E OSPITE NELLA BATTAGLIA EVOLUTIVA DEL CIRCOVIRUS SUINO DI TIPO 2 NEI MAIALI

HANS NAUWYNCK

Laboratory of Virology, Department of Translational Physiology, Infectiology and Public Health, Faculty of Veterinary medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke hans.nauwynck@ugent.be; +32 471 588 824

Il circovirus suino di tipo 2 è un virus molto piccolo a DNA che circola nei suini da molto tempo. Poiché il virus non ha una propria DNA polimerasi DNA-dipendente, la dirotta dalle cellule bersaglio mitotiche, come i linfoblasti e le cellule fetali.

Negli ultimi decenni, l'intensificazione dell'allevamento suino sta facilitando la circolazione nelle popolazioni suine di molti agenti patogeni, che a sua volta stimola fortemente la blastogenesi.

La presenza continua di un numero enorme di linfoblasti aumenta la replicazione di PCV2 (e anche di altri piccoli virus a DNA che sono dipendenti dalla DNA polimerasi dell'ospite) nel suo ospite, portando alla manifestazione di malattie associate a PCV2. Inoltre, la selezione genetica, nella direzione di suini a crescita rapida e altamente produttivi, ha portato a una migliore crescita di PCV2 nei linfoblasti e a una minore eliminazione di PCV2 da parte dei monociti.

Una conseguenza logica di questa maggiore replicazione di PCV2 è un aumento del tasso di mutazione e un'evoluzione accelerata. Seguendo la legge del "più adatto", il virus si sta adattando a una migliore replicazione nei linfoblasti. Un bell'esempio è il miglioramento del suo legame con il recettore cellulare.

Accanto a questo, l'immunità della popolazione può guidare il virus nella direzione di varianti che sfuggono l'immunità dell'ospite.

In conclusione, l'allevamento moderno e le moderne genetiche hanno dato al PCV2 l'opportunità di diventare un importante patogeno nei suini, e l'adattamento per una migliore replicazione nei linfoblasti e una migliore "fuga" dall'immunità, stanno plasmando le varianti di PCV2 del futuro.

ASPETTI PRATICI NELLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE ASSOCIATE A PCV2

FRANCISCO J. PALLARÉS

Department of Comparative Anatomy and Pathological Anatomy and Toxicology, Pathology and Immunology Group (UCO-PIG), UIC Zoonoses and Emerging Diseases (ENZOEM), Faculty of Veterinary Medicine, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), University of Cordoba, Cordoba, Spain.

E-mail: fpallares@uco.es

Il circovirus suino di tipo 2 (PCV2) è un piccolo virus senza envelope con un genoma circolare a singolo filamento di DNA, appartenente alla famiglia *Circoviridae* e al genere Circovirus. Finora sono stati descritti otto genotipi di PCV2 (PCV2a-PCV2h). Il genotipo PCV2d è il più diffuso, seguito da PCV2b e da PCV2a.

Le infezioni da PCV2 possono essere subcliniche e cliniche. In caso di infezioni cliniche, le malattie associate a PCV2 sono indicate come malattie PCV2-associate (PCVAD) e comprendono la malattia sistemica PCV2 (PCV2-SD), la malattia riproduttiva da PCV2 (PCV2-RD), la malattia respiratoria da PCV2 (PCV2-LD), la malattia enterica da PCV2 (PCV2-ED) e la sindrome dermatite-nefrita del suino (PDNS).

Infezione cliniche da PCV2 Malattia sistemica da PCV2 (PCV2-SD)

Per una diagnosi di PCV2-SD devono essere soddisfatti i criteri stabiliti da Sorden (2000) e gli animali affetti devono presentare:

- Segni clinici: ritardo della crescita e deperimento, con ingrossamento dei linfonodi inguinali e frequentemente dispnea, ittero, pallore cutaneo, diarrea o ulcere gastriche
- Lesioni istopatologiche caratteristiche: deplezione linfocitaria con istiociti e infiltrazione di cellule multinucleate giganti nei tessuti linfoidi
- Quantità da moderate ad elevate di PCV2 nelle lesioni: che possono essere valutate mediante immunoistochimica (IHC), che rileva l'antigene, o ibridazione in situ (ISH), che rileva l'acido nucleico.

La malattia colpisce tipicamente suini di 2-4 mesi di età, con una morbilità tra il 4-30%, che occasionalmente può raggiungere il 50-60%, e una mortalità del 4-20%.

Per una corretta diagnosi, vanno fatte alcune considerazioni: in primo luogo, i segni clinici non sono diagnostici poiché molte altre patologie possono causare deperimento (es. malattie respiratorie e enteriche, parassiti, ecc.). In secondo luogo, le lesioni macroscopiche non sono diagnostiche, perché l'ingrossamento dei linfonodi può essere associato a diverse condizioni o patologie. E infine, l'infezione da PCV2 non è sinonimo di PCV2-SD perché il PCV2 è ubiquitario e suini sani con tessuti linfoidi istologicamente normali possono presentare un basso numero di cellule PCV2-positive nei follicoli linfoidi.

Poiché è stata osservata una forte correlazione tra quantità di PCV2 e gravità delle lesioni microscopiche, le tecniche di quantificazione come la qPCR (PCR quantitativa) potrebbero essere potenzialmente utilizzate per la diagnosi di malattie associate a PCV2. Infatti, la qPCR è utilizzata nella pratica come metodo indicativo del coinvolgimento clinico del virus. Nei laboratori diagnostici spagnoli, i valori considerati nel siero e nei tessuti sono:

- Siero: <10² (negativo o non rilevante), 10² 10⁴ (basso o dubbio), 10⁴ 10⁵ (malattia subclinica) e >10⁵ (alta possibilità di coinvolgimento clinico).
- Tessuti: <10⁹ (malattia subclinica) e≥10⁹ (alta possibilità di coinvolgimento clinico).
 Questi valori sono utilizzati anche come riferimento per la diagnosi di altre malattie associate a PCV2.

È importante sottolineare che per la diagnosi individuale i criteri sono la presenza delle lesioni microscopiche caratteristiche, consistenti nella deplezione dei linfociti con istiociti e infiltrazione di cellule giganti multinucleate e la rilevazione di carica virale da moderata ad alta all'interno delle lesioni mediante IHC o ISH. La qPCR può essere utilizzata per la diagnosi, non sul singolo, ma sulla popolazione. Per quanto riguarda l'uso della sierologia, può essere problematico poiché i pattern di sieroconversione possono essere abbastanza simili tra aziende colpite e non.

Malattia riproduttiva da PCV2 (PCV2-RD)

Questa malattia è caratterizzata dalla comparsa di aborti tardivi e nati morti, mummificazioni e un aumento del numero di suinetti morti durante la fase di allattamento. Poiché gli embrioni sono suscettibili all'infezione da PCV2, l'azione del virus all'inizio della gestazione inddurrà morte embrionale e ritorno in calore. Quando questi ritorni sono associati a infezione da PCV2, saranno seguiti da sieroconversione per PCV2 e/o dalla positività alla PCR vicino all'evento. Ci sono discrepanze per quanto riguarda il numero reale di casi di PCV2-RD sul campo e la sua importanza come malattia riproduttiva.

Le lesioni osservate nel feto comprendono ingrossamento e congestione epatica, ipertrofia cardiaca con aree di scolorimento, ascite, idrotorace e idropericardio.

I criteri per la diagnosi di PCV2-RD sono stati stabiliti da Segalés (2012) e sono:

- Aborti tardivi e nati morti, a volte con evidente ipertrofia del cuore del feto
- Presenza di lesioni cardiache caratterizzate da miocardite fibrosante e/o necrotizzante estesa
- Presenza di elevate quantità di PCV2 nelle lesioni miocardiche e in altri tessuti fetali.
 Per la diagnosi, è consigliabile inviare feti diversi, nati morti o mummificati da scrofe abortite, poiché il virus potrebbe essere presente solo in alcuni di essi al momento del campionamento.

I segni clinici PCV2-RD sono indistinguibili da altre malattie che causano aborti tardivi e nati morti, come il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV) o *Leptospira spp*. In caso di mummificati di diverse dimensioni, dobbiamo differenziare questa malattia dall'infezione da parvovirus suino (PPV).

Malattia respiratoria da PCV2 (PCV2-LD)

Il PCV2 è uno dei principali patogeni primari coinvolti nello sviluppo del Complesso della Malattia Respiratoria Suina (PRDC), causando una polmonite interstiziale grave caratterizzata da insufficienza fino a collasso polmonare, consistenza gommosa e aree di consolidamento screziate distribuite multifocalmente in tutto il parenchima polmonare. Microscopicamente, i polmoni colpiti presentano infiltrazione settale con cellule mononucleate, ipertrofia e iperplasia dei pneumociti di tipo II e aumento dell'essudato bronchiolare e alveolare. Per la diagnosi differenziale, la polmonite interstiziale causata da PCV2 è macroscopicamente e microscopicamente indistinguibile da quella causata da PRRSV, quindi devono essere utilizzate altre tecniche di laboratorio, come IHC, ISH o qPCR, per una corretta diagnosi finale.

La malattia respiratoria di solito colpisce i suini tra le 8 e le 26 settimane di età e i principali segni clinici sono ritardo della crescita e deperimento, febbre, tosse, dispnea e pelo ruvido. Questi segni sono molto simili a quelli osservati in PCV2-SD, e per una corretta diagnosi differenziale dovremo

considerare che in PCV2-SD una delle caratteristiche della malattia è la presenza di lesioni linfoidi sistemiche, un fatto che non si verifica nel PCV2-LD. Per questo motivo, dobbiamo conferire diversi tessuti linfoidi insieme ai polmoni per raggiungere una diagnosi definitiva.

Malattia enterica da PCV2 (PCV2-ED)

PCV2 può causare nei suini in accrescimento-ingrasso una patologia caratterizzata dalla presenza di diarrea con ispessimento della mucosa, in particolare dell'ileo e delle prime sezioni del colon, e linfonodi mesenterici ingrossati. Microscopicamente, la lesione corrisponde a un'enterite granulomatosa e a una deplezione linfocitaria con infiammazione granulomatosa nelle placche di Peyer (ma non in altri tessuti linfoidi), associata alla presenza di PCV2 (antigene o acido nucleico). La lesione è macroscopicamente simile all'adenomatosi intestinale cronica o subacuta (enteropatia proliferativa) causata da *Lawsonia intracellularis*, sebbene in questo caso la lesione microscopica più caratteristica sia la proliferazione di cellule epiteliali immature della cripta che danno origine a cripte iperplastiche e displastiche.

Sindrome dermatite-nefrite del suino (PDNS)

Questa sindrome può colpire suini in svezzamento, magronaggio o ingrasso, con una prevalenza <1% (talvolta superiore), e una mortalità vicina al 100% nei suini di età superiore ai 3 mesi e al 50% negli animali più giovani. La malattia è caratterizzata dalla presenza cutanea di macule e papule irregolari, da rosso a viola, principalmente negli arti posteriori e nella zona perineale, con emorragie sottocutanee ed edema. Nei suini in fase di recupero dalla fase acuta della malattia, si possono osservare cicatrici cutanee. Entrambi i reni appaiono ingranditi con piccole petecchie corticali ed edema della pelvi renale. Altre lesioni osservate sono linfonodi ingrossati e, occasionalmente, infarti della milza.

I criteri per la diagnosi di un caso di PDNS sono (Segalés 2012):

- Lesioni cutanee emorragiche e necrotizzanti (arti posteriori e area perineale) e/o reni ingrossati e pallidi con petecchie corticali generalizzate
- Vasculite necrotizzante sistemica e glomerulonefrite fibrinosa necrotizzante

PCV2 può essere rilevato in casi di PDNS ma, poiché l'antigene scatenante della malattia è ancora sconosciuto, la rilevazione di PCV2 non è un requisito diagnostico.

Per le lesioni cutanee, prenderemo in considerazione una diagnosi differenziale con malattie come erisipela, pitiriasi rosea, setticemia, peste suina africana e classica, sindrome da stress suino (ipertermia maligna) e altri processi patologici che causano eritema transitorio (ristagno di urina sul pavimento, ustioni chimiche, ecc.). Per le lesioni renali, è necessario effettuare una diagnosi differenziale con la peste suina africana e classica e le patologie setticemiche.

Infezione subclinica da PCV2 (PCV2-SI)

Questa è la manifestazione PCV2 più comune poiché l'infezione da virus è ubiquitaria. Non ci sono segni clinici evidenti e talvolta si osserva solo una diminuzione di alcuni parametri produttivi come l'incremento medio giornaliero. Come lesioni microscopiche, si nota, se presente, una lieve deplezione dei linfociti con infiammazione granulomatosa nei tessuti linfoidi, con quantità scarsa o assente di PCV2 (antigene o acido nucleico). I valori di qPCR indicativi di infezioni subcliniche utilizzati come riferimento nei laboratori diagnostici spagnoli sono 10^4 - 10^8 nel siero e $< 10^9$ nei tessuti.

Nuovi circovirus (PCV3 e PCV4)

PCV3 è stato identificato per la prima volta nel 2015-2016 negli Stati Uniti a causa del sequenziamento massiccio effettuato in seguito all'utilizzo della metagenomica. Questo virus è stato associato a malattie riproduttive (aborti, nati morti, nati deboli e mummificati), PDNS,

miocardite (feti e suinetti nati deboli), encefalite (suinetti nati deboli) e periarterite sistemica (suini svezzati). È stato rilevato sia in animali malati che sani e sta circolando nella popolazione suina in modo endemico. La prevalenza delle malattie associate è ancora sconosciuta. Le tecniche diagnostiche per PCV3 come ISH, qPCR e sequenziamento vengono offerte nei laboratori diagnostici in Spagna.

PCV4 è stato scoperto in Cina nel 2019 in suini con sintomi respiratori ed enterici e PDNS. Il significato clinico e la patogenesi di questo virus richiedono ulteriori indagini.

Campionamento per la diagnosi

Un campionamento adeguato è molto importante per raggiungere una diagnosi corretta. Qui di seguito vengono indicati alcuni consigli da considerare quando si raccolgono campioni per la diagnosi di malattie associate a PCV2, ma anche per altre malattie.

Selezione di animali per l'autopsia

Selezionare diversi animali (almeno 2-3) con malattia acuta e segni clinici conclamati, evitando la selezione di animali con malattia cronica. Se i maiali sono morti, selezionare solo animali morti di recente. Se possibile, scegliere maiali non medicati.

Istopatologia

Prelevare campioni il prima possibile, comprendendo tessuti lesionati e non lesionati. La fissazione avviene per immersione dei campioni in formalina tamponata al 10% (può essere preparata utilizzando 1 parte di formalina e 9 parti di acqua di rubinetto). Lo spessore del campione deve essere massimo di 1 cm e la proporzione tessuto:formalina intorno a 1:10. Utilizzare contenitori di plastica con chiusura ermetica e corretta identificazione, non refrigerare il contenitore con i campioni perché può ritardare il processo di fissazione. Importante, i campioni per l'istopatologia non dovrebbero mai essere congelati. Quando possibile, utilizzare un doppio contenitore per evitare perdite e fuoriuscite.

PCR

Utilizzare contenitori o sacchetti di plastica sterili con una corretta identificazione. Questa tecnica può essere eseguita su diversi tipi di campioni: tamponi tissutali, nasali, tracheali o bronchiali, lavaggi broncoalveolari, fluidi orali, feci, ecc. Il congelamento è adatto per i campioni da sottoporre a PCR.

Sierologia

Meglio inviare campioni di siero in provette di plastica (tipo Eppendorf) o da prelievo, correttamente identificati. Il siero può essere congelato, ma non congelare la provetta con il coagulo.

Batteriologia

Utilizzare provette o sacchetti di plastica sterili con una corretta identificazione, refrigerati. I tessuti o i tamponi con terreno di crescita sono campioni adatti per la batteriologia. Se si utilizzano organi cavi inviarli con margini legati e non mescolare campioni di intestino con altri campioni nello stesso contenitore.

IMPORTANTE!!! Quando si inviano campioni diversi per diversi approcci diagnostici, utilizzare contenitori differenti tra loro per evitare la contaminazione incrociata, che potrebbe non rendere validi i risultati ottenuti (come quelli derivati dalla perdita di fuoriuscita di formaldeide).

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

PESTE SUINA AFRICANA IN ITALIA: GESTIONE DELL'ALLERTA E DELLE EMERGENZE

AFRICAN SWINE FEVER IN ITALY; ALERT AND EMERGENCY MANAGEMENT

ISCARO C.¹, RUOCCO L.², DI SABATINO D.³, SORDILLI M.², PACELLI F.², ROLESU S.⁴, CHIAVACCI L.⁵, SCARAMOZZINO P.⁶, FELIZIANI F.¹

- ¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche "Togo Rosati", Centro di Referenza Nazionale per lo studio delle malattie da Pestivirus e da Asfivirus, Perugia, ITALIA;
- ² Ministero della Salute, Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari, Ufficio III, Roma, ITALIA;
- ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise "Giuseppe Caporale", Centro di Referenza Nazionale per l'Epidemiologia Veterinaria, la Programmazione, l'Informazione e l'Analisi del Rischio, Teramo, ITALIA;
- ⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Sassari, ITALIA;
- ⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, ITALIA;

Parole chiave: Peste Suina Africana, Sorveglianza, Eradicazione *Keywords:* African Swine Fever, Surveillance, Eradication

RIASSUNTO

L'Italia sta affrontando la sfida sanitaria relativa alla Peste Suina Africana (PSA), che rappresenta una minaccia globale per il settore zootecnico suinicolo. Il Piano Nazionale di Sorveglianza ed Eradicazione per la PSA prevede misure diversificate, da attuarsi nelle zone indenni e nei territori infetti, nonché in regione Sardegna. L'attuale situazione epidemiologica vede la presenza di due cluster di infezione (Piemonte/Liguria e Lazio) con trend completamente diversi tra loro: mentre nel primo caso il rischio che l'infezione sia ormai endemica nel cinghiale e che possa trasmettersi alla popolazione suinicola limitrofa è significativo, nel secondo la riduzione della curva di incidenza, a fronte di una sorveglianza significativa, è una prova oggettiva di controllo della malattia nel territorio. Inoltre, in Sardegna il processo di eradicazione è ormai proiettato alla sua fase finale e la regione ha ottenuto un notevole ridimensionamento del livello di rischio per PSA. Sul resto del territorio nazionale, la preparazione all'emergenza appare una esigenza non più rimandabile, così come la necessità di aumentare il livello di sensibilità del sistema di sorveglianza passiva ai fini della *early detection* del virus.

ABSTRACT

Italy is facing the health challenge related to African Swine Fever (ASF), a global threat to the pig livestock sector. The ASF National Surveillance and Eradication Plan provides for diversified measures to be implemented in free areas and infected territories, as well as in Sardinia region. The current epidemiological situation includes the presence of two clusters of infection (Piedmont/Liguria and Latium): in the former case the risk that the infection is now endemic in wild boar and can be transmitted to the neighbouring kept pig population is significant, in the latter the reduction of the incidence curve, evaluating as significative the surveillance results, shows the chance for an effective disease control in the territory. Moreover, in Sardinia, the eradication process is now projected to its final stage, and

⁶ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma, ITALIA.

the region has achieved a significant reshaping of ASF risk level. In the remaining national territory, emergency preparedness appears to be a need no longer postponed; the sensivity level of the passive surveillance system could be increased for the purpose of virus early detection

INTRODUZIONE

La Peste Suina Africana (PSA) è attualmente presente in tutti i continenti, seppure con scenari epidemiologici diversi (1). In Africa la malattia è presente in forma endemica nei suidi domestici e selvatici, dove le scarse condizioni di biosicurezza favoriscono la persistenza dell'infezione nei domestici, mentre il ciclo silvestre comprende diversi reservoirs asintomatici (zecche molli e suidi selvatici africani). In **Europa**, la prima ondata epidemica (genotipo I), partita alla fine degli anni '50 del 1900, è stata faticosamente eradicata; la coda permane tutt'oggi in Sardegna. Dal 2007 si è registrata una seconda ondata epidemica (genotipo II) che, dal Caucaso, si è diffusa ampiamente e attualmente coinvolge diversi paesi dal Mar Baltico fino al Mediterraneo. In Asia la malattia è stata introdotta dal 2018 in Cina, e da allora l'infezione si è diffusa in molti paesi del Sud-Est asiatico, essendo oltretutto sottostimata. In Oceania la PSA ha colpito alcune isole del Pacifico e minaccia direttamente l'Australia. Situazione simile in America, dato che la malattia è presente ad Haiti e Santo Domingo. Lo scopo del lavoro è quello di riportare una analisi descrittiva della gestione della malattia in Italia, sia relativamente alla sorveglianza applicata ai territori indenni sia in relazione al processo di eradicazione avviato nei territori recentemente infetti; viene considerata anche la gestione del piano di eradicazione in Sardegna.

MATERIALI E METODI

In Italia la gestione della malattia è regolamentata dal Piano Nazionale di Sorveglianza ed Eradicazione per la PSA (2). Esso comprende una parte relativa alle misure di sorveglianza da applicare nei territori indenni; una parte relativa alle misure di eradicazione da attuare nei territori continentali in caso di malattia; una parte relativa alle misure di eradicazione in Sardegna. Inoltre, le regioni che hanno notificato la presenza della malattia nel 2022 hanno emanato un Piano di eradicazione calibrato sui territori di competenza, redatto in collaborazione con il Ministero della Salute e con il Centro di Referenza Nazionale per le Pesti Suine (CEREP). La analisi descrittiva è stata basata su diverse fonti di dati: sistema informativo SINVSA per le attività di sorveglianza nei territori indenni, dashboard PSA per le attività di eradicazione nei territori continentali infetti, datawarehouse PSA per il piano di eradicazione in Sardegna.

La sorveglianza passiva che si applica nei territori indenni è rendicontata attraverso il sistema SINVSA, che gestisce i dati di segnalazione, campionamento ed esiti dei test biomolecolari, inseriti dai Servizi Veterinari e dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali per le relative parti di competenza. Il Piano Nazionale prevede il controllo delle carcasse di cinghiali rinvenute nell'ambiente, comprese quelle di animali coinvolti in incidenti stradali, e di un campione prelevato dai suini domestici trovati morti negli allevamenti. Le altre attività riguardano la gestione della popolazione dei cinghiali; la verifica delle misure di biosicurezza esistenti negli allevamenti suinicoli nazionali; la programmazione e la esecuzione di efficaci campagne di comunicazione/informazione/formazione per tutti gli stakeholders. Il Piano, approvato dalla Commissione Europea e cofinanziato, è ufficialmente partito nel 2020, e viene aggiornato su base annuale. La dashboard PSA rappresenta uno strumento di consultazione ed aggiornamento in tempo reale, messo a punto in seguito alla notifica della malattia nelle regioni continentali e destinato agli addetti ai lavori. La strategia di eradicazione della PSA

nel selvatico, così come indicata dalla normativa vigente (3) e dalle linee guida comunitarie (4), prevede l'attuazione di misure in grado di contenere la malattia all'interno delle zone infette, riducendo progressivamente l'area di circolazione virale, ed evitare che l'infezione si trasmetta dai selvatici ai domestici. Tra le attività per limitare la diffusione della infezione, il rafforzamento della sorveglianza passiva e l'implementazione del monitoraggio attivo per la ricerca delle carcasse rappresentano le misure di emergenza da attuarsi nell'immediato, per stimare l'estensione dell'infezione, valutare l'andamento epidemiologico e fronteggiare l'avanzamento della malattia. Dopo l'installazione di adeguate recinzioni, con la funzione di ostacolare lo spostamento dei cinghiali dagli areali infetti a quelli indenni e viceversa, è possibile procedere con le attività di selezione e controllo dei cinghiali. Nell'ambito delle misure di eradicazione, è prevista la possibilità di attuare alcune attività di sorveglianza attiva. Il datawarehouse PSA è in grado di raccogliere i dati provenienti da tutte le fonti informative e di validarli in base alla consistenza: attraverso il loro costante monitoraggio, è possibile la verifica periodica dell'andamento del Piano di eradicazione della Sardegna. Tale Piano dal 2015 prevede misure di controllo nell'ambito della corretta identificazione dei suini, della biosicurezza negli allevamenti suinicoli, della intensificazione del processo di accreditamento delle aziende stesse, sulla base di parametri sanitari, produttivi e riproduttivi. E'stata istituita l'Unità di Progetto per la gestione multidisciplinare della problematica e per un efficace coordinamento di tutti gli enti coinvolti, con la centralizzazione della catena di comando ai fini della gestione del rischio. Sono state adottate misure per migliorare l'efficacia dei controlli ufficiali da parte dei Servizi Veterinari su tutta la filiera, istituendo un Gruppo di Intervento Veterinario altamente specializzato. La misura più incisiva, che ha consentito un netto miglioramento della situazione epidemiologica e gestionale sebbene abbia causato forti contrasti con la popolazione locale, è rappresentata dalla localizzazione dei branchi dei suini bradi illegali e dal loro successivo abbattimento.

RISULTATI

Territorio continentale indenne

Nell'ambito del Piano di Sorveglianza Nazionale, nonostante gli indicatori mostrino un trend in crescita dal 2020, le attività richieste hanno generato alcune criticità e l'applicazione delle misure rimane al disotto delle aspettative. I Servizi Veterinari hanno mostrato una certa resistenza ad interagire con altre amministrazioni che si occupano di fauna selvatica, attività ritenuta fino ad oggi di competenza marginale, e alcune difficoltà ad accettare i meccanismi legati all'applicazione della sorveglianza passiva rispetto alla sorveglianza attiva, che ha contraddistinto le attività legate ai grandi piani di eradicazione in passato. Inoltre, le segnalazioni di cinghiali sono poco numerose, e in generale riguardano prevalentemente animali incidentati, che ai fini della sorveglianza passiva hanno uno scarso valore predittivo, piuttosto che animali rinvenuti morti nel proprio ambiente naturale. Per quanto riguarda i domestici, si nota una notevole difficoltà da parte dei Servizi Veterinari ad intercettare i morti in stalla, soprattutto in quelle realtà piccole e familiari che rappresentano il principale target della sorveglianza passiva per PSA nel settore domestico. In generale, i diversi problemi applicativi che sono stati riscontrati nell'implementazione delle misure previste dal Piano, sono stati risolti dalle Regioni con diversi livelli di efficacia.

Regioni Piemonte e Liguria

L'infezione da PSA è stata riscontrata a gennaio 2022 grazie alle attività di sorveglianza passiva (5); il virus probabilmente era stato introdotto diversi mesi prima ed ha avuto il tempo di diffondersi in un'ampia zona a cavallo dell'Appennino tra Liguria e Piemonte. La reazione delle autorità centrali è stata immediata ed efficace nell'applicazione delle

misure di emergenza: identificazione dell'area di circolazione virale, e divieto di caccia e altre attività outdoor considerate a rischio; censimento, controllo e depopolamento degli allevamenti suinicoli, a partire da quelli a carattere estensivo; organizzazione di un sistematico monitoraggio del territorio per verificare la dimensione dell'epidemia. Le autorità locali hanno man mano mostrato crescenti perplessità a condividere le misure di restrizione, lamentando sin da subito la scarsità di fondi da impiegare. Inizialmente è stato fatto ricorso al volontariato (cacciatori, escursionisti) e solo in minima parte a personale forestale; alla lunga la collaborazione dei volontari e l'esiguità del personale delle amministrazioni hanno portato a una riduzione dello sforzo di ricerca delle carcasse. La presenza di due barriere autostradali che di fatto circondano il core della zona infetta ha contribuito solo in parte a contenere l'infezione: d'altronde, il primo caso riscontrato nel comune di Oyada (AL) era già fuori da questo contenimento virtuale. Pertanto gli esperti hanno suggerito sin da subito la costruzione di recinzioni utili a rallentare la diffusione del virus e consentire la messa in atto di strategie di depopolamento in sicurezza al di fuori della zona infetta, quando opportunamente contenuta. Allo stato attuale, la barriera ipotizzata è stata realizzata in ritardo rispetto alle tempistiche previste e non ancora completata, a causa di rallentamenti burocratici, difficoltà gestionali, mancanza dei fondi. Da agosto 2022, sono stati riscontrati numerosi casi all'esterno delle barriere, tanto da richiedere successive espansioni delle zone di restrizione; attualmente, i casi più recenti al di fuori del tracciato delle barriere, ad ovest e ad est, sono stati riscontrati in territori dove i dati della ricerca attiva delle carcasse sono piuttosto scarsi.

Regione Lazio

Attualmente il cluster nel comune di Roma Capitale è l'unico attivo. Il caso riscontrato in provincia di Rieti è stato derubricato a caso sospetto non confermato, in base ad una serie di riscontri epidemiologici che hanno permesso di completare le informazioni sanitarie ed ecologiche, inizialmente carenti. L'area infetta nel Lazio è attualmente contenuta all'interno del Grande Raccordo Anulare (GRA), nella popolazione di cinghiali residente all'interno del Parco dell'Insugherata. La barriera costituita dal GRA è stata rinforzata e, sebbene non possa essere considerata completamente chiusa e priva di possibili varchi, ha efficacemente impedito la diffusione del virus nell'agro romano. Due casi registrati nella zona di Labaro (RM) sono rimasti isolati e considerati un epifenomeno. Le azioni di depopolamento sono state eseguite mediante trappolaggio e abbattimento dei cinghiali catturati, al confine tra la zona infetta e la zona adiacente. A novembre 2022, a fronte del trend epidemiologico sensibilmente in calo, la ricerca e la rimozione delle carcasse è stata effettuata anche nell'area di circolazione virale attiva della zona infetta, all'interno del GRA, al fine di massimizzare il recupero delle carcasse non ancora rinvenute e di eliminare possibili fonti di infezione per la popolazione di cinghiali residua. Ci sono evidenze che l'infezione non abbia raggiunto altre aree verdi presenti all'interno dell'area urbana romana, nonostante sia segnalata la presenza di cinghiali e non si possa escludere connessioni tra le diverse subpopolazioni. Le misure applicate dimostrano di aver avuto una apprezzabile efficacia tanto che, da settembre 2022, non si sono registrati ulteriori casi di infezione. La sorveglianza passiva, all'interno e all'esterno del GRA, nonostante alcune difficoltà organizzative, è sufficientemente rappresentativa della situazione.

Regione Sardegna

Dopo oltre 40 anni di presenza dell'infezione nell'isola, a dicembre 2022 la Sardegna ha ottenuto di rivedere il livello di rischio attributo dalla Commissione Europea nei confronti della PSA (6). Dal 2011 l'intera isola era infatti considerata al massimo livello di rischio, che attualmente è stato ridotto a circa 20 comuni nella parte storicamente endemica. La

zona infetta per il selvatico negli ultimi anni è stata sensibilmente ridotta e la sorveglianza è in grado di rilevare solo sporadici sieropositivi che rappresentano la coda del processo di eradicazione. La svolta vincente è legata alla rimozione del pascolo brado illegale di suini, che favoriva la persistenza del virus tra la popolazione selvatica e i suini domestici. Il governo regionale, supportato dal Ministero della Salute e dal CEREP, ha condotto azioni mirate che hanno avviato un vero e proprio cambiamento socio-culturale nella popolazione locale, favorendo gli allevamenti sani, supportando economicamente il miglioramento degli standard di biosicurezza, implementando un'efficace politica di contrasto all'illegalità, anche mediante azioni di forza pubblica, e infine aumentando la vigilanza e la sorveglianza nelle attività venatorie.

DISCUSSIONE

Territorio continentale indenne

La sorveglianza passiva, sebbene problematica e difficoltosa dal punto di vista applicativo, rappresenta lo strumento di elezione sia per la *early detection* (ingresso del virus in zona indenne) sia per qualsiasi analisi epidemiologica, tanto in zona indenne quanto in zona infetta. Il sistema veterinario pubblico, inteso come sistema regionale e locale, incontra molte difficoltà nella gestione, il coordinamento e l'applicazione di questo tipo di sorveglianza, sia per i cinghiali che per i domestici. In molti casi, la necessaria collaborazione tra istituzioni diverse e competenti sui vari aspetti della problematica PSA si è realizzata solo in parte o non si è realizzata affatto, probabilmente anche a causa di una scarsa consapevolezza del rischio. E'evidente la necessità di un maggiore sforzo in termini di formazione e organizzazione per migliorare questo aspetto.

Regioni continentali infette

Nei due attuali cluster di infezione, la situazione epidemiologica è completamente diversa. In Piemonte e Liguria, l'evoluzione del trend epidemiologico, estremamente dinamica e preoccupante, mostra un avanzamento del fronte epidemico, con il rilevamento lento e constante di casi, il conseguente allargamento delle zone di restrizione a più riprese, la concreta possibilità che l'infezione sia ormai endemica in un'ampia parte del territorio in restrizione, l'aumentato rischio di coinvolgimento del settore domestico. La conformazione del territorio e l'ampiezza dell'area infetta rendono molto difficile la applicazione delle misure di sorveglianza passiva, che di conseguenza non è né efficace nel perseguire gli obiettivi richiesti né rappresentativa del territorio in cui si svolge. Tuttavia, la applicazione di misure di eradicazione efficaci è ormai un'esigenza non rimandabile, dato che il rischio di un ulteriore allargamento della zona infetta è tangibile. Da ricordare che in provincia di Cuneo, a nord-ovest del cluster di infezione, insiste un'area densamente popolata di aziende suinicole intensive, mentre ad est si estende la filiera produttiva di suini e prodotti derivati della pianura padana, eccellenza del Paese. Gli esperti lamentano da tempo una sostanziale mancata e ritardata applicazione della strategia inclusa nel piano di eradicazione presentato a giugno 2022 alla Commissione Europea e, al contrario, l'avvio di azioni autonome da parte delle regioni coinvolte, in contrasto con questa strategia e con le linee guida comunitarie. Diversamente, nel cluster di Roma Capitale, sebbene il rischio di diffusione del virus attraverso il fattore umano sia considerato molto alto e, contestualmente, l'adozione di misure di restrizione drastiche non sia sostenibile per lungo tempo in un contesto urbano, nella zona infetta l'andamento epidemiologico è stabile, grazie alle misure di controllo intraprese e alla collaborazione con enti non sanitari nella ricerca attiva delle carcasse. L'attuale situazione epidemiologica rappresenta un rallentamento della fase epidemica, molto probabilmente dovuto alla drastica riduzione della popolazione di cinghiali, a causa del tasso di letalità della malattia, dell'abbattimento dei cinghiali catturati e del blocco degli spostamenti dei cinghiali dall'esterno all'interno delle zone di restrizione.

In generale, diverse criticità sono state individuate dagli esperti, quali ad esempio

- 1. Rapporti istituzionali. In alcuni casi, i ruoli di coordinamento e di applicazione delle misure da applicare per il controllo dell'infezione tra il livello centrale e periferico sono problematici, evidenziando soprattutto un gap di condivisione degli obiettivi e la percezione di priorità da considerare.
- 2. Gestione dei cacciatori. La collaborazione dei cacciatori è sicuramente necessaria sia per allestire un'efficace sistema di allerta sia per perseguire gli obiettivi di ridimensionamento della densità e della distribuzione del cinghiale sul territorio. Sebbene esistano importanti conflitti di interesse, è necessario collaborare a una gestione comune di ridimensionamento della specie, adottando opportune azioni di vigilanza del territorio e nuovi sistemi di prelievo venatorio.
- 3. Cinghiali in aree urbane. La presenza di questi animali in ambiente urbano è in costante aumento e deve essere affrontata in forme adeguate distinguendo gli opportuni contesti. Il rischio di introduzione del virus in cinghiali a contatto con i rifiuti urbani è altissimo e devono essere applicate misure di riduzione del numero dei cinghiali per minimizzare le possibili conseguenze.
- 4. Problematiche di ordine sociale. In tutto il paese è evidente una crescente spinta dell'opinione pubblica verso l'attivismo animalista. Sia a Roma che a Genova sono state riportate forme di protesta verso le misure da applicare per il controllo dell'infezione da PSA nei cinghiali, che talvolta hanno sconfinato in vere e proprie azioni di sabotaggio. Analoghi problemi sono legati alla "Human Dimension" in termini di difficoltà di accettazione delle restrizioni derivanti dalla presenza dell'infezione da parte di allevatori, cacciatori, stakeholders, addetti del settore. Una ulteriore criticità è rappresentata dalla detenzione di suini in qualità di *pet*; le norme attuali sono insufficienti e si associano ad una completa mancanza di consapevolezza dei rischi legati alla gestione dei *pet-pigs* in tema di contrasto alla diffusione della PSA.

Regione Sardegna

La applicazione di misure di eradicazione adeguate al contesto epidemiologico ha permesso, nel giro di alcuni anni, la rimozione delle cause di persistenza dell'infezione e il mantenimento di un efficace controllo del territorio. Il risultato ottenuto, in netta controtendenza rispetto a quanto si sta registrando in Europa e nel mondo, è sorprendente. Nonostante la complessità e l'onerosità del processo implementato, è stato dimostrato che l'eradicazione della PSA è possibile, perseguendo rigorose misure di restrizione in modo mirato ed agendo sul fronte culturale per mitigare il rischio di persistenza e diffusione dell'infezione. I tempi sono ormai maturi per riuscire a dimostrare l'avvenuta completa eradicazione del virus sulla base delle linee guida riconosciute dalla Commissione Europea (7).

CONCLUSIONI

Nelle zone attualmente indenni la priorità è rappresentata dalla necessità di evitare l'introduzione della malattia e, nel caso in cui questo non riesca, individuare il più precocemente possibile l'ingresso del virus nel territorio, anche attraverso il coinvolgimento di enti non sanitari per rafforzare la sorveglianza passiva. Nelle zone infette di Piemonte e Liguria appare urgente ripensare la strategia di eradicazione, avviare un adeguato sistema di monitoraggio dell'evoluzione dell'infezione ed adottare misure adeguate a impedire l'ampliamento dell'area infetta, minimizzando i rischi di esportazione del virus ad altri contesti attraverso il fattore umano. Nella zona infetta di Roma Capitale appare indispensabile mantenere lo

sforzo di sorveglianza passiva rafforzata che è stato messo in campo sin da subito, allo scopo di mantenere la rappresentatività del sistema e procedere con l'ultima fase della strategia di eradicazione. In Regione Sardegna è necessaria una verifica generale della situazione epidemiologica riguardo il processo di eradicazione della PSA, che consenta di indirizzare gli sforzi di sorveglianza e di vigilanza verso la messa a punto di un sistema di controllo del territorio più adeguato al riconoscimento della definitiva eradicazione dell'infezione.

BIBLIOGRAFIA

- 1. WOAH (2023), "African Swine Fever (ASF) Situation Report 26" https://www.woah.org/en/document/african-swine-fever-asf-situation-report-26/
- 2. Ministero della Salute (2023), "Piano Nazionale di Sorveglianza ed Eradicazione della Peste Suina Africana" https://www.salute.gov.it/portale/pesteSuinaAfricana/dettaglioContenutiPSA.jsp?lingua=italiano&id=5956&area=pesteSuinaAfricana&menu=vuoto
- 3. Unione Europea (2023), "Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio del 9 marzo 2016 relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale»)" https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A02016R0429-20210421&qid=1674828024614
- Commissione Europea (2020), "WORKING DOCUMENT SANTE/7113/2015: Strategic approach to the management of African Swine Fever for the EU Rev 12, 29/04/2020" https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-04/ad_control-measures_asf_wrk-doc-sante-2015-7113.pdf
- Iscaro C., Dondo A., Ruocco L., Masoero L., Giammarioli M., Zoppi S., Guberti V., Feliziani F. (2022) "January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy". Transbound. Emerg. Dis. 2022;69(4):1707-1711.
- Unione Europea (2022), "Regolamento (UE) 2022/2486 della Commissione del 16 dicembre 2022 recante modifica dell'allegato I del regolamento di esecuzione (UE) 2021/605 che stabilisce misure speciali di controllo della peste suina africana" https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32022R2486&q id=1674828985626
- 7. EFSA (2021), "ASF Exit Strategy: Providing cumulative evidence of the absence of African swine fever virus circulation in wild boar populations using standard surveillance measures" https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6419

DISINFETTANTI VS PSA: STATO DELL'ARTE TRA CONOSCENZE E LACUNE

DISINFECTANTS VS PSA: AN OVERVIEW BETWEEN KNOWLEDGE AND GAPS

BEATO M.S., D'ERRICO F., FELIZIANI F.

CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LE PESTI SUINIE, (CEREP) ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE "TOGO ROSATI".

Via G. Salvemini 1, 06126 Perugia, Italy

Parole chiave: Peste Suina Africana, disinfettanti *Keywords*: African Swine Fever, disinfectants

RIASSUNTO

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia infettiva virale con un alto tasso di mortalità nei suidi domestici e selvatici, causata da un virus a DNA a doppio filamento (dsDNA), attualmente classificato come unico membro della famiglia *Asfarviridae*, genere *Asfivirus*. Il virus si trasmette per contatto diretto attraverso animali infetti e/o zecche e indiretto attraverso fomiti quali superfici, indumenti, calzature, attrezzature e mezzi di trasporto. L'uomo svolge un importante ruolo di veicolo meccanico.

La malattia è riscontrata in Unione Europea dal 2014, colpendo 14 su 27 paesi, tra cui, di recente, la penisola italiana. Al momento non sono disponibili vaccini sicuri e efficaci per combattere la malattia, pertanto l'applicazione di rigorose misure di biosicurezza rappresenta una misura di controllo essenziale. Corrette procedure di pulizia e decontaminazione sono necessarie sia come strumenti di prevenzione che di mitigazione del rischio, da attuare in corso di focolai di PSA. La rapida diffusione della PSA ha evidenziato le molteplici carenze di conoscenza su diversi aspetti della malattia e sulle caratteristiche del virus, tra cui la resistenza ad agenti chimici e fisici. La disponibilità di dati sulla resistenza ad agenti chimici del virus consente di individuare misure e strumenti idonei per corrette azioni di decontaminazione

Attraverso uno studio approfondito sui dati disponibili attualmente in letteratura, è stato possibile individuare e riassumere i principali composti chimici testati sperimentalmente contro il virus della PSA. Inoltre sono stati analizzati i metodi adottati per valutarne l'attività virucida contro la PSA in comparazione a metodi standard applicati per la registrazione di prodotti biocidi in Europa. Tale studio ha fatto emergere le conoscenze disponibili e le lacune di dati e approcci per lo studio di sostanze chimiche ad attività virucida contro la PSA.

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is an infectious viral disease with a high mortality rate in domestic and wild pigs, caused by a double-stranded DNA virus (dsDNA), currently classified as the only member of the family *Asfarviridae*, genus *Asfivirus*. The virus is transmitted by direct contact through infected animals or ticks and indirectly through fomites such as surfaces, clothing, footwear and agricultural implements. ASF reached the European Union in 2014, affecting 14 of the 27 EU countries including, recently, the Italian peninsula. Its rapid spread has revealed many gaps in knowledge about the mode of transmission and environmental resistance of the virus. There are currently no safe and effective vaccines available to combat the disease; therefore biosecurity is an essential control measure. Cleaning and disinfection procedures are needed both

as prevention and mitigation tools to be implemented in the field during ASF outbreaks. Through an in-depth study of the data available in the literature, it has been possible to identify and summarize the main chemical compounds effective against ASF and the standardized methods adopted to evaluate their virucidal activity. Such study highlighted the gaps in knowledge regarding data on chemicals active against ASFV and the experimental protocols adopted to investigate the virucidal activity of chemical compounds.

INTRODUZIONE

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia emorragica che colpisce suidi domestici e selvatici di tutte le età mostrando tassi di mortalità molto elevati (1). La malattia è causata da un virus a DNA a doppio filamento (dsDNA) di grandi dimensioni del genere *Asfivirus* unico membro della famiglia *Asfarviridae* (2). Il virione ha una struttura complessa, di tipo icosaedrico con oltre 170 Open Reading Frames (ORF) che codificano per numerose proteine con funzioni ancora incerte e/o da scoprire (3-5). Ad oggi sono riconosciuti 24 genotipi (I-XXIV) (6-11), tutti rilevati nel continente africano, e classificati in base alle caratteristiche del gene B646L codificante per la proteina p72, su cui si basa anche la diagnosi molecolare. Le modalità di trasmissione della PSA sono sia dirette, attraverso animali infetti e/o zecche, che indirette attraverso fomiti contaminati, oggetti e superfici inanimate che fungono da vettori di trasmissione. Inoltre l'uomo svolge un importante ruolo di veicolo meccanico. In assenza di vaccini, la biosicurezza rappresenta lo strumento essenziale di prevenzione e di controllo di questa infezione.

La PSA è diventata probabilmente la malattia epizootica più rilevante dal punto di vista della salute animale nell'ultimo decennio, colpendo diverse regioni a livello globale. A seguito dell'introduzione del genotipo II in Georgia nel 2007, il virus è stato identificato in Russia con successiva diffusione verso ovest, in Europa nel 2014 e verso est in Cina nel 2018 (12,13). Successivamente la PSA è stata riscontrata anche in diversi paesi asiatici (14,15). La sua rapida diffusione nell'ultimo decennio ha suscitato grande preoccupazione per le conseguenze sulla salute animale e per gli impatti economici diretti e indiretti. Tale preoccupazione è aumentata drammaticamente con l'effettiva conferma della PSA in 14 dei 27 paesi dell'UE e, di recente, anche nei cinghiali nell'Italia peninsulare (16,17). I recenti focolai di PSA registrati nei paesi europei hanno evidenziato la scarsità di dati e informazioni su diversi aspetti della malattia e del virus. Uno di questi è rappresentato dalla resistenza agli agenti fisici e chimici del virus. I dati sull'efficacia di prodotti e composti chimici utilizzabili contro la PSA sono utili per pianificare corrette azioni di decontaminazione. Pertanto il presente lavoro, intende fornire una panoramica dei dati sinora disponibili su prodotti e composti chimici testati contro la PSA e sulle metodologie applicate per determinarne l'attività virucida evidenziando la presenza di dati frammentari e di metodologie non idonee a mimare situazioni di campo.

MATERIALI E METODI

<u>Iter autorizzativo per i biocidi</u>

Nel 2012 è stato adottato il Regolamento Europeo (EU) n.528/2012 (BPR) entrato in vigore dall'1 Gennaio 2013, che concerne l'immissione sul mercato e l'uso di biocidi, utilizzati per la tutela dell'uomo, degli animali, dei materiali o contro organismi nocivi, quali parassiti, batteri o virus, mediante l'azione dei principi attivi contenuti nel biocida. Il Regolamento EU n.528/2012 abroga la direttiva 98/8/CE, e inserisce i disinfettanti nella categoria dei biocidi e non più nella categoria dei presidi medico-chirurgici (PMC). Pertanto a seguito dell'introduzione del nuovo regolamento Europeo (n.528/2012), i prodotti presenti sul mercato nazionale possono essere commercializzati come PMC ancora per due anni (fino al 2024) prima di dover essere obbligatoriamente autorizzati come biocidi. L'Agenzia europea per le sostanze chimiche

(ECHA), che attua la legislazione dell'Unione europea in materia di sostanze chimiche, è l'organo tecnico di approvazione dei biocidi in Europa. Tutti i biocidi devono ottenere un'autorizzazione prima di poter essere immessi sul mercato. L'approvazione dei principi attivi avviene a livello dell'Unione Europea e la successiva autorizzazione dei biocidi viene attuata a livello degli Stati membri. Il processo autorizzativo può avvenire in uno dei seguenti modi:

- Autorizzazione nazionale per immettere il biocida nel mercato di un singolo Stato membro
- Autorizzazione per riconoscimento reciproco per estendere l'autorizzazione al commercio del biocida in altri Stati membri dell'Unione
- Autorizzazione dell'Unione ossia richiesta di autorizzazione al commercio del biocida in tutti gli Stati membri

Ai fini dell'autorizzazione i principi attivi devono essere testati in base ad alcuni protocolli definiti (Standard) e in base al tipo di prodotto ("Product type"- PT") ovvero l'uso. I prodotti usati per l' "Igiene veterinaria" appartengono ai prodotti di tipo 3 (PT3) ovvero sono: "[......] disinfettanti, saponi disinfettanti, prodotti per l'igiene orale o corporale o con funzione antimicrobica. Prodotti usati per disinfettare i materiali e le superfici associati al ricovero o al trasporto degli animali". Per la presentazione delle domande e lo scambio di dati e informazioni tra richiedente, ECHA, autorità competenti dello Stato membro e Commissione europea è utilizzata un'apposita piattaforma informatica, il registro per i biocidi (R4BP 3) in cui però non sono presenti i prodotti commercializzati ancora come PMC.

<u>Protocolli per testare l'attività virucida dei composti chimici nel settore veterinario</u>

Secondo la classificazione di Holl e Youngner 1959 (18) e sulla base della loro resistenza agli agenti chimici, i virus possono essere distinti in 3 categorie:

<u>Categoria A:</u> virus di dimensioni medio-grandi, contengono envelope e sono molto suscettibili ai detergenti, saponi e tutti i disinfettanti, alla disidratazione e spesso non persistono a lungo a meno che l'ambiente non sia umido e fresco

<u>Categoria B:</u> virus di dimensioni inferiori, privi di membrana lipidica e sono relativamente resistenti ai disinfettanti lipofili come i detergenti

<u>Categoria C:</u> virus che hanno caratteristiche intermedie per dimensioni e sensibilità ai disinfettanti antivirali rispetto al gruppo A e al gruppo B.

Il virus della PSA appartiene alla categoria A, cui appartengono virus sensibili all'azione di comuni disinfettanti antivirali quali: alcali, aldeidi, acidi, cloro e composti a base di cloro, composti a base di iodio, agenti ossidanti, composti fenolici e composti di ammonio quaternario. Nell'UE, i metodi per testare l'efficacia di disinfettanti e antisettici sono stati sviluppati dal Comitato Tecnico 216 (TC216) del Comitato europeo di normalizzazione (CEN) dal 1989 (19-21). Questi metodi prevedono tre fasi di test su disinfettanti e antisettici. Questo modello è appunto identificato come tri-fasico. Ogni fase consta di test (Standard) da eseguire per verificarne l'efficacia. In breve:

<u>Fase 1:</u> Test di sospensione generico, utilizzato per determinare l'attività virucida di un disinfettante indipendentemente dalle aree di applicazione

<u>Fase 2–Step 1</u>: Test di sospensione, specifico per campo di applicazione, utilizzato per simulare in laboratorio differenti condizioni d'uso (UNI EN 14675:2015) (22)

<u>Fase 2–Step 2</u>: Test in modalità carrier, che prevede l'essiccazione del virus su differenti tipologie di superfici che simulano l'ambiente di utilizzo (UNI EN 17122:2020) (23)

<u>Fase 3</u>: Test condotti in campo, in condizioni pratiche di utilizzo, attualmente non sviluppati ovvero per i quali non è disponibile nessuno standard

Il test di sospensione (Fase 2-stadio 1) è basato sul contatto del virus in coltura cellulare con il disinfettante in forma liquida. Al contrario, nel test in modalità carrier (Fase 2- stadio 2), il virus è essiccato su una superficie (porosa o non porosa), e successivamente esposto ad un

disinfettante, spruzzato o messo a contatto nella sua forma liquida. Successivamente le due tipologie di test saggiano al termine di un tempo di contatto prestabilito, la quantità di virus vitale residua (Figura 1 e 2). Gli standard indicano l'abbattimento della carica virale post contatto del disinfettante (valore espresso come differenza tra la quantità di virus pre e post- esposizione) che si deve ottenere per indicare che il disinfettante ha superato il test. Una riduzione del titolo di 3 o 4 log10, a seconda del PT, stabilisce l'efficacia del prodotto. In breve, i composti chimici da testare vengono diluiti con acqua ad una determinata durezza (Tabella 1, Figura 1). Il test di sospensione secondo la norma UNI EN 14675:2015 indica la possibilità di eseguire le prove in presenza sostanze interferenti: l'albumina sierica bovina (BSA) (3.0 g/L) simula un livello basso delle condizioni di "sporco" mentre una maggiore concentrazione di BSA (10 g/L) più estratto di lievito (YE) 10 g/L simula una condizione di sporco di alto livello. Una parte della sospensione del virus è mescolata con una parte della sostanza interferente e incubata a +10 °C per 2 minuti (min). Successivamente, vengono aggiunte otto parti della sostanza chimica da testare. La miscela ottenuta, composta da virus, sostanza chimica da testare e sostanza interferente (miscela in esame - "test substance") viene incubata a +10 °C per 30 min, condizione di prova identificata come obbligatoria. Temperature e tempi di contatto aggiuntivi a quelli obbligatori (+10 C e 30 min) possono essere testati secondo le indicazioni d'uso del composto chimico in esame. Successivamente a questo tempo di contatto, la miscela è posta in ghiaccio allo scopo di fermare l'attività virucida del prodotto chimico in esame. La miscela in esame è successivamente diluita al fine di eseguire una titolazione virale in coltura cellulare e valutare il titolo residuo del virus dopo il contatto con il prodotto/disinfettante in esame (Figura 1).

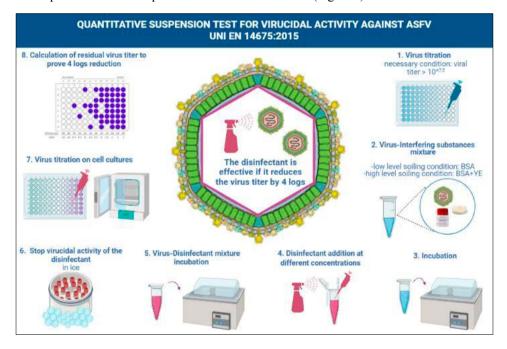


Figura 1. Test in sospensione per valutare l'attività virucida dei disinfettanti contro la PSA secondo la norma UNI EN 14675:2015. Creato in Biorender.com (https://biorender.com/), ultimo accesso l'8 marzo 2022.

Figure 1. Quantative Suspension Test for virucidal activity against ASFV according to the UNI EN 14675:2015 standard. Created in Biorender.com (https://biorender.com/), last accessed on 8th March 2022.

Le norme UNI EN che descrivono i protocolli da adottare per valutare l'attività virucida di una sostanza/principio attivo per il settore veterinario indicano che tutti i prodotti devono essere testati contro il *Bovine enterovirus I* per poi essere riconosciuti e autorizzati come virucidi e pertanto utilizzabili contro tutti i virus in ambito veterinario. Ne consegue che a scopo regolatorio una sostanza, per essere immessa sul mercato con la dicitura "virucida" in etichetta, deve essere testata secondo il modello trifase sopra descritto e obbligatoriamente contro il *Bovine entorvirus I* e non necessariamente contro altri virus.

In USA il processo è similare, poiché gli standard da seguire prevedono test in sospensione (ASTM 1052:20) e in modalità carrier (ASTM 1053:20); tuttavia ogni prodotto è registrato specificatamente contro il virus utilizzato nel test (Figura 2).

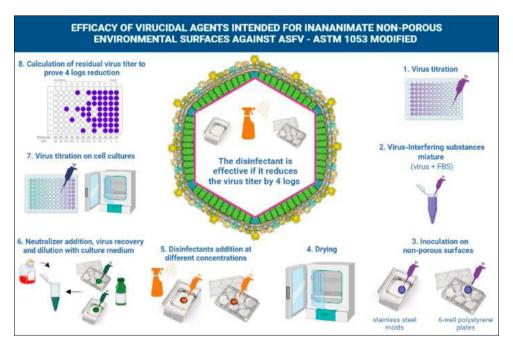


Figura 2. Metodo di prova applicato per valutare l'attività virucida del disinfettante su inanimati non porosi superfici ambientali secondo gli standard ASTM E1053-20. La figura riporta il metodo adottato da Krug et al. (24) per PSA. Creato in Biorender.com (https://biorender.com/), ultimo accesso 8 marzo 2022. FBS: siero bovino fetale.

Figure 2. Test-method applied to assess the virucidal activity of disinfectant on inanimate non-porous environmental surfaces according to ASTM E1053-20 standards. The figure reports the method modified by Krug et al; 2011 for ASFV. Created in Biorender.com (https://biorender.com/), last accessed on 8th March 2022.

Gli standard a livello internazionale presentano alcune differenze tra loro, quali il rapporto disinfettante/virus, la temperatura obbligatoria, il tempo di contatto, la presenza e la tipologia delle sostanze interferenti, che costituiscono differenze/variabili cruciali tra i metodi di prova (Tabella 1).

Tabella 1. Differenze tra i test in sospensione e i test carrier. **Table 1.** Differences between suspension tests and test carriers.

	UNI EN 14675:2015 TEST IN SOSPENSIONE (Fase 2/Step 1)	ASTM E1053-20 TEST CARRIER (VETRO)	
VOLUME DEL VIRUS	1000 μL	200 μL	
VOLUME DEL DISINFETTANTE	8000 μL	2000 μL	
RATIO	1:8	1:10	
SOSTENZE INTERFERENTI	1% BSA + 1% YE O SOLO 0.3% BSA	NON RICHIESTO	
TEMPO DI CONTATTO E TEMPERATURA	30 min ± 10 s + 10 °C ± 1 °C	INDICAZIONI DEL PRODUTTORE + 20–25°C	
ACQUA	400 ppm	400 ppm	
RIDUZIONE DEL TITOLO VIRALE	4 log ₁₀	4 log ₁₀	

RISULTATI

Dagli studi disponibili in letteratura in merito a prodotti e principi attivi testati contro la PSA, si evince che sono stati applicati: test in sospensione, secondo la UNI EN 14675:2015 o metodi leggermente modificati e test di carrier secondo la ASTM 1053:2020 con alcune modifiche (Figura 2). Il maggior numero di studi è stato eseguito con il metodo in sospensione e un numero minoritario con il metodo carrier, che maggiormente si avvicina a simulare le reali condizioni di campo.

I prodotti e principi attivi testati contro la PSA possono essere raggruppati in otto categorie: acidi, alcali, aldeidi, cloro e composti del cloro, composti dello iodio, agenti ossidanti, composti fenolici e composti dell'ammonio quaternario (QAC). Inoltre, recentemente, diversi estratti vegetali sono stati testati contro la PSA. Un elenco dei prodotti e principi chimici testati contro la PSA, secondo gli studi disponibili in letteratura, è riportato in Tabella 2. I dati disponibili riguardanti l'efficacia dei composti chimici contro la PSA indicano che tutti i gruppi di sostanze chimiche testate sono efficaci contro il virus, differendo per la modalità di azione e l'applicabilità su diversi materiali (Tabella 2). E' da sottolineare che la Tabella 2 elenca i composti e prodotti chimici testati contro la PSA ma che non necessariamente sono stati autorizzati come virucidi per il settore veterinario. Dal punto di vista applicativo è richiesto l'utilizzo di biocidi registrati e che siano virucidi. La lista di principi attivi registrati e autorizzati come virucidi per il settore veterinario ai sensi del nuovo regolamento n.528/2012 è disponibile sul sito web dell'ECHA (https://echa.europa.eu/it/home). Tale lista al momento non include i prodotti che sono ancora commercializzati come PMC sul territorio nazionale e che per norma transitoria entro il 2024 devono essere autorizzati come biocidi ai sensi del regolamento n.528/2012.

Tabella 2. Elenco dei principi e composti testati e attivi contro la PSA con le indicazioni dei parametri a cui l'efficacia è stata osservata. **Table 2.** List of principles and compounds tested and active against PSA with indications of the parameters at which the efficacy was observed.

GRUPPO CHIMICO/ PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO	TEMPO DI CONTATTO (min)	TEMPERATURA (°C)	GENOTIPO	GENOTIPO CONDIZIONI	METODO UTILIZZATO	BIBLIOGRAFIA	UTILIZZO SUGGERITO
ALCALI								
	1%	S	4	VIII	Liquame suino	sospensione	(25)	Non efficace a
IDROSSIDO DI SODIO	2 e 3%	30	10	Ι	BSA; BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	TA. Non usare in presenza di alluminio e leghe derivate
IDROSSIDO DI CALCIO	1%	5	4	ΜΛ	Liquame suino	sospensione	(25)	Utilizzare per pareti e pavimenti
ACIDI								
A CHOO A CEPTOO	1%	10	22	Ι	Acciaio e plastica	ASTM E1053 modificata	(24)	
ACIDO ACETICO	2%	30	10	Ι	BSA; BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	
ACIDO CITRICO	2%	30	22	I	Legno di betulla	ASTM E1053 modificata	(27)	Abiti e decontaminazione personale
COMPOSTI DEL CLORO								
	500ppm	10	22	Ι	Acciaio e plastica	ASTM E1053 modificata	(24)	Efficace nella maggior parte delle
	2000ppm	30	22	Ι	Legno di betulla	ASTM E1053 modificata	(27)	applicazioni, in presenza di materiale organico l'efficacia
SODIO IPOCLORITO	%9	30	TA	I		sospensione	(28)	diminuisce. Meno
	1%	30	10	-	BSA, BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	stabile in condizioni climatiche calde e di sole al di sopra dei +15°C. Tossico per occhi e pelle

GRUPPO CHIMICO/ PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO	TEMPO DI CONTATTO (min)	TEMPERATURA (°C)	GENOTIPO	CONDIZIONI	METODO UTILIZZATO	BIBLIOGRAFIA	UTILIZZO SUGGERITO
ACQUA ELETTROLIZZATA ACIDA	80ppm	30	4	П	5% FBS	sospensione	(29)	
AGENTI OSSIDANTI								
ACQUA OZONIZZATA (03)	20mg/L	10	20-25	П	Acciaio, plastica e calcestruzzo	sospensione	(30)	
	mdd009	10	TA	I		ASTM E1053 modificata	Krug 2018 (31)	
	1/200	30	20	II		sospensione	(32)	Strumentazione di Iaboratorio.
IDORGENO DI POTASSIO	1/200	30	4 e 20	II		sospensione	(32)	Leggermente
	1%	30	10	I	BSA, BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	corrosivo per i metalli
	2 e 5%	5, 10	20-25	Ι	BSA+YE+BM	OECD 2013	(33)	
PEROSSIDO DI IDROGENO VAPORIZZATO	30%	30	30-40	Ι	5% FBS	Vaporizzazione	(34)	Strumentazione di Iaboratorio
PEROSSIDODI IDROGENO (H202)	102.6mM (35% soluzione madre)	10	48	П	Plasma	sospensione	(35)	Strumentazione di laboratorio. Risciacquare dopo l'uso
ALDEIDI								
CULTERABATEME	0.1%	30	10	Ι	BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(36)	Evitare il contatto
GEOTANALDEIDE	1%	30	10	I	BSA	UNI EN 14675:2015	(26)	con occhi e pelle
COMPOSTI FENOLICI								
FENOLO	1%	30	01	-	BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	Efficace in presenza di materiale organico, risciacquare dopo l'uso

GRUPPO CHIMICO/ PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO	TEMPO DI CONTATTO (min)	TEMPERATURA (°C)	GENOTIPO	GENOTIPO CONDIZIONI	METODO UTILIZZATO	BIBLIOGRAFIA	UTILIZZO SUGGERITO
o-FENIL FENOLO	0.5%	09	TA	П		in vivo test	(37)	
SALI QUATERNARI DI AMMONIO								
BENZALCONIO CLORURO	1%	30	10	I	BSA	UNI EN 14675:2015	(26)	
AMMONIO QUATERNARIO	1/200	1	4	П		sospensione	(32)	Per uso nersonale
CLORURO DI DIDECILDIMETILAMMONIO	10%	30	TA	П		sospensione	(38)	non usare con acqua
AMMONIO QUATERNARIO	800pm	10	TA	П	Acciaio, plastica e calcestruzzo	ASTM E1053 modificata	(31)	
COMPOSTI DELLO IODIO								
POVIDONE-IODINE (5% CONTENUTO DI IODIO)	5%	15	TA	Ш		Spray	(39)	
POTASSIO TETRAGLICINA TRIIODURO		30	TA	Ι		sospensione	(38)	
ESTRATTI DI PIANTE								
MENTA	30%	30	10	Ι	BSA; BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(40)	
TA: temperatura ambiente BSA: albumina sierica bovina YE: estratto di lievito FBS: siero fetale bovino BM: mucina bovina								

I composti del cloro e gli agenti ossidanti, raccomandati dal manuale WOAH sulla PSA (41) sono i composti maggiormente testati. Entrambi i gruppi di sostanze chimiche dipendono fortemente dall'assenza di materiale organico per essere altamente efficaci. Pertanto, quando questi composti sono selezionati per un uso in campo, è necessaria un'accurata pulizia preliminare. Sono stati condotti esigui studi su aldeidi, composti fenolici e composti di iodio. In particolare, i composti fenolici sembrano essere efficaci in presenza di materiale organico e sono a basso costo (42), mentre non sono disponibili dati sull'attività virucida degli alcoli contro la PSA. Sulla base dei dati disponibili, l'ipoclorito di sodio ha un'ottima efficacia contro la PSA che diminuisce in presenza di materiale organico. L'ipoclorito di sodio può essere irritante e corrosivo, limitandone l'applicazione in diversi contesti. Gli agenti ossidanti sono composti potenti. Tuttavia, durante le procedure di decontaminazione, presentano corrosività per diversi metalli e questo dovrebbe essere preso in considerazione quando si pianifica la decontaminazione degli allevamenti. La glutaraldeide è ampiamente utilizzata nel settore veterinario, ma può essere irritante per cute e occhi. Sono disponibili pochi studi sulla sua efficacia contro la PSA e ulteriori indagini in diversi contesti sperimentali potrebbero chiarirne l'efficacia e l'uso durante focolai di PSA. I composti fenolici possono avere una buona gamma di applicazioni. Sembrano essere efficaci contro la PSA e rimangono efficaci anche in presenza di materiale organico. Per quanto riguarda la decontaminazione degli indumenti, in base ai dati disponibili in letteratura, possono essere utilizzati acidi e QAC in quanto sicuri ed efficaci contro la PSA

DISCUSSIONE

La biosicurezza è definita in diversi modi da organismi internazionali come il WOAH (41) e FAO (43) e presenta una definizione precisa secondo l'Animal Health Law (44). Tutte le definizioni disponibili descrivono la biosicurezza come un insieme di misure, procedure e atteggiamenti che hanno l'obiettivo comune di ridurre il rischio di introduzione e diffusione di una malattia. Una valutazione dei fattori di rischio per l'introduzione e la diffusione secondaria della PSA è quindi imprescindibile per individuare efficaci misure di biosicurezza che si basino su contenimento, pulizia e disinfezione. La decontaminazione diventa quindi una delle principali procedure di mitigazione necessarie, da attuare e pianificare correttamente. La decontaminazione è un processo complesso che dipende principalmente dalla disponibilità di informazioni di riferimento sulla resistenza fisica e chimica del virus e, in secondo luogo, dalle caratteristiche del locale/ambiente da decontaminare, dalle condizioni climatiche al momento della decontaminazione, dal costo della stessa, dalla disponibilità di adeguate quantità di prodotti efficaci e sicuri per l'ambiente e il personale. In questa prospettiva, la standardizzazione del processo di decontaminazione rappresenta un processo impegnativo.

Il presente lavoro riassume i dati attualmente disponibili sull'efficacia di composti chimici e disinfettanti contro la PSA, evidenziando alcuni aspetti che meritano attenzione per studi futuri. La maggior parte degli studi disponibili ha adottato standard e linee guida internazionali al fine di valutare l'attività virucida delle sostanze oggetto di studio [15,18,22,45-50], rendendo i dati confrontabili e riproducibili. E' da notare che la maggior parte degli studi disponibili sull'efficacia virucida dei prodotti contro la PSA ha adottato il metodo della sospensione secondo la UNI EN 14675:2015. Questo metodo è ben lungi dal riprodurre una condizione di campo in cui il virus non è in sospensione ma, piuttosto, associato a fluidi corporei, tessuti ed escrezioni e superfici. Infatti, secondo la norma UNI EN 14675:2015, la presenza del materiale organico è approssimata dall'uso di BSA e YE come sostanze interferenti che possono diminuire l'attività disinfettante. Al contrario,

gli standard basati sul metodo di test carrier imitano meglio una condizione sul campo, poiché il protocollo prevede di testare l'efficacia di prodotti chimici su superfici (carrier). Per quanto riguarda i dati disponibili sull'attività virucida dei composti chimici contro la PSA che adottano i metodi di test carrier su superfici non porose (ad esempio, ASTM 1053:20), sono disponibili solo quattro studi (27,33). In particolare, è disponibile un solo lavoro sulle superfici porose, a sostegno della necessità di aumentare il numero di studi su diversi tipi di superfici (33). Questi studi hanno testato tre tipi di superfici: plastica, acciaio e cemento, messe a contatto con sostanze chimiche appartenenti a composti di cloro, agenti ossidanti, QAC e acidi, suggerendo che potrebbero essere condotti ulteriori studi testando composti aggiuntivi e differenti tipologie di materiale (24,27,33).

Per quanto riguarda la varietà di ceppi di PSA utilizzati per testare l'attività virucida dei composti chimici, è emerso che questi sono limitati all'uso di virus appartenenti al genotipo I e in particolare adattati in laboratorio, come i ceppi BA71V e Lisbon 60. Pochi studi hanno utilizzato ceppi di campo (19,27,47-51) appartenenti al genotipo I e II e solo uno studio ha utilizzato un ceppo di PSA appartenente al genotipo VIII (25). Ciò evidenzia che non sono attualmente disponibili studi sull'efficacia virucida di composti chimici contro virus della PSA appartenenti al genotipo II circolanti in Europa.

La scarsità di dati sull'efficacia virucida di disinfettanti contro ceppi di campo di PSA potrebbe derivare dalla difficoltà a coltivare il virus su colture cellulari in laboratorio. Il virus della PSA è infatti coltivabile su linee cellulari primarie ovvero macrofagi di suino ottenuti a partire da sangue in toto raccolto da animali vivi. Questa procedura è laboriosa e non consente di ottenere elevati titoli virali necessari per poter dimostrare l'avvenuto abbattimento del titolo virale di 4 logaritmi, come richiesto dagli standard internazionali di riferimento. Questo rappresenta uno dei principali limiti tecnici nell'applicazione degli standard internazionali disponibili per testare l'attività virucida di sostanze chimiche contro la PSA.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro evidenzia che esistono ancora lacune nelle conoscenze sull'efficacia dei composti chimici contro la PSA. Sono necessari ulteriori studi per convalidare i dati sull'efficacia dei composti chimici testati in diverse condizioni sperimentali. Le metodologie finora applicate per studiare l'attività virucida delle sostanze chimiche sono limitate a protocolli di laboratorio che non riflettono adeguatamente la situazione sul campo. Dovrebbero essere sviluppati protocolli di laboratorio aggiuntivi, con l'obiettivo di simulare la varietà degli scenari epidemiologici in cui la PSA può essere identificata. La PSA è un virus complesso che causa una malattia complessa, in grado di infettare sia la popolazione domestica che quella selvatica. Tale complessità si riflette nella gestione della malattia, con approcci diversi in base al contesto e anche nella fase di decontaminazione che, pertanto, può essere pianificata e sviluppata in modi diversi a seconda dello scenario di campo. Ciò implica che potrebbero essere necessari protocolli e procedure di decontaminazione ad hoc. La disponibilità di dati sull'attività virucida delle sostanze chimiche e il loro uso contro la PSA pertanto diventa cruciale e studi in tale settore dovrebbero essere incoraggiati.

A ciò si affianca la necessità di disporre di un elenco aggiornato e di facile consultazione dei principi attivi autorizzati come virucidi sul territorio nazionale per il settore veterinario permettendo la selezione e l'utilizzo di prodotti efficaci e sicuri per l'ambiente e per il personale, ricordando che gli stessi sono autorizzati in base a standard che prevedono l'uso del *Bovine enterevirus 1*.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Dixon, L.K.; Abrams, C.C.; Bowick, G.; Goatley, L.C.; Kay-Jackson, P.C.; Chapman, D.; Liverani, E.; Nix, R.; Silk, R.; Zhang, F. African Swine Fever Virus Proteins Involved in Evading Host Defence Systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, *100*, 117–134. https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2004.04.002.
- Alonso, C.; Borca, M.; Dixon, L.; Revilla, Y.; Rodriguez, F.; Escribano, J.M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. J. Gen. Virol. 2018, 99, 613–614. https://doi. org/10.1099/JGV.0.001049.
- 3. Andrés, G.; García-Escudero, R.; Simón-Mateo, C.; Viñuela, E. African Swine Fever Virus Is Enveloped by a Two-Membraned Collapsed Cisterna Derived from the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.* 1998, 72, 8988–9001. https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8988-9001.1998.
- 4. Breese, S.S.; Stone, S.S.; Deboer, C.J.; Hess, W.R. Electron Microscopy of the Interaction of African Swine Fever Virus with Ferritin-Conjugated Antibody. *Virology* 1967, *31*, 508–513. https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90232-2.
- Carrascosa, J.L.; Carazo, J.M.; Carrascosa, A.L.; García, N.; Santisteban, A.; Viñuela, E. General Morphology and Capsid Fine Structure of African Swine Fever Virus Particles. Virology 1984, 132, 160–172. https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90100-4.
- 6. Qu, H.; Ge, S.; Zhang, Y.; Wu, X.; Wang, Z. A Systematic Review of Genotypes and Serogroups of African Swine Fever Virus. *Virus Genes* 2022, *58*, 77–87. https://doi.org/10.1007/S11262-021-01879-0.
- Bastos, A.D.S.; Penrith, M.L.; Crucière, C.; Edrich, J.L.; Hutchings, G.; Roger, F.; Couacy-Hymann, E.; Thomson, G.R. Genotyping Field Strains of African Swine Fever Virus by Partial P72 Gene Characterisation. *Arch. Virol.* 2003, *148*, 693–706. https://doi. org/10.1007/S00705-002-0946-8.
- 8. Lubisi, B.A.; Bastos, A.D.S.; Dwarka, R.M.; Vosloo, W. Molecular Epidemiology of African Swine Fever in East Africa. *Arch. Virol.* 2005, *150*, 2439–2452. https://doi.org/10.1007/S00705-005-0602-1.
- 9. Boshoff, C.I.; Bastos, A.D.S.; Gerber, L.J.; Vosloo, W. Genetic Characterisation of African Swine Fever Viruses from Outbreaks in Southern Africa (1973–1999). *Vet. Microbiol.* 2007, *121*, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.007.
- 10. Achenbach, J.E.; Gallardo, C.; Nieto-Pelegrín, E.; Rivera-Arroyo, B.; Degefa-Negi, T.; Arias, M.; Jenberie, S.; Mulisa, D.D.; Gizaw, D.; Gelaye, E.; et al. Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017, *64*, 1393–1404. https://doi.org/10.1111/TBED.12511.
- 11. Quembo, C.J.; Jori, F.; Vosloo, W.; Heath, L. Genetic Characterization of African Swine Fever Virus Isolates from Soft Ticks at the Wildlife/Domestic Interface in Mozambique and Identification of a Novel Genotype. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, 65, 420–431. https://doi.org/10.1111/TBED.12700.
- 12. Chenais, E.; Depner, K.; Guberti, V.; Dietze, K.; Viltrop, A.; Ståhl, K. Epidemiological Considerations on African Swine Fever in Europe 2014–2018. *Porc. Health Manag.* 2019, *5*, 6. https://doi.org/10.1186/s40813-018-0109-2.
- 13. Cwynar, P.; Stojkov, J.; Wlazlak, K. African Swine Fever Status in Europe. *Viruses* 2019, *11*, 310. https://doi.org/10.3390/v11040310.
- 14. Dixon, L.K.; Sun, H.; Roberts, H. African Swine Fever. *Antiviral Res.* 2019, *165*, 34–41. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018.
- 15. Blome, S.; Franzke, K.; Beer, M. African Swine Fever—A Review of Current Knowledge. *Virus Res.* **2020**, *287*, 198099. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198099.
- 16. Iscaro C, Dondo A, Ruocco L, Masoero L, Giammarioli M, Zoppi S, Guberti V, Feliziani

- F. January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy. Transbound Emerg Dis. 2022 Jul;69(4):1707-1711. doi: 10.1111/tbed.14584. Epub 2022 May 31. PMID: 35511712: PMCID: PMC9540274
- Iscaro, C., Dondo, A., Ruocco, L., Masoero, L., Giammarioli, M., Zoppi, S., Guberti, V., & Feliziani, F.. January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy. Transboundary and Emerging Diseases, 69, 1707–1711. https://doi.org/10.1111/tbed.14584
- Holl, H.; Youngner, J.S. Virus-Lipid Interactions. II. The Mechanism of Adsorption of Lipophilic Viruses to Water-Insoluble Polar Lipids. *Virology* 1959, 8, 319–343. https://doi.org/10.1016/0042-6822(59)90033-9.
- 19. Gebel, J.; Exner, M.; French, G.; Chartier, Y.; Christiansen, B.; Gemein, S.; Goroncy-Bermes, P.; Hartemann, P.; Heudorf, U.; Kramer, A.; et al. The Role of Surface Disinfection in Infection Prevention. *GMS Hyg. Infect. Control* 2013, 8, Doc10. https://doi.org/10.3205/DGKH000210.
- 20. EN 14885:2018; Chemical disinfectants and antiseptics Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics. CEN/TC 216 Chemical disinfectants and antiseptics. Available online: https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/25a6be49-689b-4ac0-b0fc-0f06f0dadf60/en-14885-2018 (accessed on 20 June 2022).
- 21. Tarka, P.; Nitsch-Osuch, A. Evaluating the Virucidal Activity of Disinfectants According to European Union Standards. *Viruses* 2021, *13*, 534. https://doi.org/10.3390/V13040534.
- 22. EN 14675:2015; Chemical Disinfectants and Antiseptics—Quantitative Suspension Test for the veterinary area. CEN/TC 216 Chemical disinfectants and antiseptics.

 Available online:https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/a4bf27b1-bb63-4574-9c27-89b4fa6eb4f9/en-14675-2015 (accessed on 16 March 2022).
- 23. UNI EN 17122:2020; Chemical disinfectants and antiseptics Quantitative non-porous surface test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area. CEN/TC 216 Chemical disinfectants and antiseptics. Available online: https://store.uni.com/p/UNI1607369/uni-en-171222020-294125/UNI1607369 EEN (accessed on 20 June 2022).
- 24. Krug, P.W.; Lee, L.J.; Eslami, A.C.; Larson, C.R.; Rodriguez, L. Chemical Disinfection of High-Consequence Transboundary Animal Disease Viruses on Nonporous Surfaces. *Biologicals* 2011, *39*, 231–235. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.06.016.
- 25. Turner, C.; Williams, S.M. Laboratory-Scale Inactivation of African Swine Fever Virus and Swine Vesicular Disease Virus in Pig Slurry. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 148–157. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00802.x.
- 26. Juszkiewicz, M.; Walczak, M.; Mazur-Panasiuk, N.; Woźniakowski, G. Effectiveness of Chemical Compounds Used against African Swine Fever Virus in Commercial Available Disinfectants. *Pathogens* 2020, *9*, 878. https://doi.org/10.3390/pathogens9110878.
- 27. Krug, P.W.; Larson, C.R.; Eslami, A.C.; Rodriguez, L.L. Disinfection of Foot-and-Mouth Disease and African Swine Fever Viruses with Citric Acid and Sodium Hypochlorite on Birch Wood Carriers. *Vet. Microbiol.* 2012, *156*, 96–101. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.032.
- 28. Shirai, J.; Kanno, T.; Tsuchiya, Y.; Mitsubayashi, S.; Seki, R. Effects of Chlorine, Iodine, and Quaternary Ammonium Compound Disinfectants on Several Exotic Disease Viruses. *J. Vet. Med. Sci.* 1999, *62*, 85–92. https://doi.org/10.1292/jvms.62.85.
- Rhee, C.H.; Kim, S.; Kang, Y.E.; Han, B.; Seo, S.J.; Kim, Y.W.; Her, M.; Jeong, W. Virucidal Efficacy of Acidic Electrolyzed Water (Aew) against African Swine Fever Virus and Avian Influenza Virus. *J. Vet. Med. Sci.* 2021, 83, 201–207. https://doi.org/10.1292/jvms.20-0534.

- 30. Zhang, L.; Luo, Y.; Wang, W.; Sun, Y.; Zhang, J.; Fatima, M.; Jia, X.; Qiu, H.J. Efficient Inactivation of African Swine Fever Virus by Ozonized Water. *Vet. Microbiol.* 2020, 247, 108796. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108796.
- 31. Krug, P.W.; Davis, T.; O'Brien, C.; LaRocco, M.; Rodriguez, L.L. Disinfection of Transboundary Animal Disease Viruses on Surfaces Used in Pork Packing Plants. *Vet. Microbiol.* 2018, *219*, 219–225. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.029.
- 32. Sovijit, W.; Taesuji, M.; Rattanamas, K.; Punyadarsaniya, D.; Mamom, T.; Nguyen, H.T.; Ruenphet, S. In Vitro Cytotoxicity and Virucidal Efficacy of Potassium Hydrogen Peroxymonosulfate Compared to Quaternary Ammonium Compound under Various Concentrations, Exposure Times and Temperatures against African Swine Fever Virus. *Vet. World* 2021, *14*, 2936–2940. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2936-2940.
- 33. Gabbert, L.R.; Neilan, J.G.; Rasmussen, M. Recovery and Chemical Disinfection of Footand-Mouth Disease and African Swine Fever Viruses from Porous Concrete Surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 2020, *129*, 1092–1101. https://doi.org/10.1111/jam.14694.
- 34. Heckert, R.A.; Best, M.; Jordan, L.T.; Dulac, G.C.; Eddington, D.L.; Sterritt, W.G. Efficacy of Vaporized Hydrogen Peroxide against Exotic Animal Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, *63*, 3916–3918. https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3916-3918.1997.
- 35. Kalmar, I.D.; Cay, A.B.; Tignon, M. Sensitivity of African Swine Fever Virus (ASFV) to Heat, Alkalinity and Peroxide Treatment in Presence or Absence of Porcine Plasma. *Vet. Microbiol.* 2018, *219*, 144–149. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.025.
- 36. Juszkiewicz, M.; Walczak, M.; Mazur-Panasiuk, N.; Woźniakowski, G. Virucidal Effect of Chosen Disinfectants against African Swine Fever Virus (ASFV) Preliminary Studies. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019, *22*, 777–780. https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.131407.
- 37. Stone, S.S.; Hess, W.R. Effects of Some Disinfectants on African Swine Fever Virus. *Appl. Microbiol.* 1973, 25, 115–122. https://doi.org/10.1128/aem.25.1.115-122.1973.
- 38. Shirai, J.; Kanno, T.; Tsuchiya, Y.; Mitsubayashi, S.; Seki, R. Effects of Chlorine, Iodine, and Quaternary Ammonium Compound Disinfectants on Several Exotic Disease Viruses. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, *62*, 85–92. https://doi.org/10.1292/jvms.62.85.
- 39. Pan, L.; Luo, R.; Wang, T.; Qi, M.; Wang, B.; Sun, M.; Luo, Y.; Ji, C.; Sun, Y.; Qiu, H.J. Efficient Inactivation of African Swine Fever Virus by a Highly Complexed Iodine. *Vet. Microbiol.* 2021, *263*, 109245. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109245.
- 40. Juszkiewicz, M.; Walczak, M.; Woźniakowski, G.; Szczotka-Bochniarz, A. Virucidal Activity of Plant Extracts against African Swine Fever Virus. *Pathogens* 2021, *10*, 1357. https://doi.org/10.3390/pathogens10111357.
- 41. OIE. Terrestrial Animal Health Code: General Provisions; OIE: Paris, France, 2019; Volume 1, ISBN 9789295108851.
- 42. De Benedictis, P.; Beato, M.S.; Capua, I. Inactivation of Avian Influenza Viruses by Chemical Agents and Physical Conditions: A Review. *Zoonoses Public Health* 2007, *54*, 51–68. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01029.
- 43. FAO. FAO Biosecurity Toolkit. In *Portal*; FAO: Roma, Italy, 2007; 128p.
- 44. Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the area of animal health ('Animal Health Law') Official Journal of the European Union.
- 45. Chenais, E.; Depner, K.; Guberti, V.; Dietze, K.; Viltrop, A.; Ståhl, K. Epidemiological Considerations on African Swine Fever in Europe 2014–2018. Porc. Health Manag. 2019, 5, 6.
- 46. Animal Disease Information System (ADIS) https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/animal-disease-information-system-adis_en. (accessed on 16 March 2022).
- 47. Pereira De Oliveira, R.; Hutet, E.; Lancelot, R.; Paboeuf, F.; Duhayon, M.; Boinas, F.; Pérez de León, A.A.; Filatov, S.; Le Potier, M.F.; Vial, L. Differential Vector Competence

- of Ornithodoros Soft Ticks for African Swine Fever Virus: What If It Involves More than Just Crossing Organic Barriers in Ticks? *Parasites Vectors* 2020, *13*, 618. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04497-1.
- 48. Jori, F.; Bastos, A.D.S. Role of Wild Suids in the Epidemiology of African Swine Fever. *Ecohealth* 2009, *6*, 296–310. https://doi.org/10.1007/s10393-009-0248-7.
- 49. Jori, F.; Vial, L.; Penrith, M.L.; Pérez-Sánchez, R.; Etter, E.; Albina, E.; Michaud, V.; Roger, F. Review of the Sylvatic Cycle of African Swine Fever in Sub-Saharan Africa and the Indian Ocean. *Virus Res.* 2013, *173*, 212–227. https://doi.org/10.1016/j. virusres.2012.10.005.
- 50. De Lorenzi, G.; Borella, L.; Alborali, G.L.; Prodanov-Radulović, J.; Štukelj, M.; Bellini, S. African Swine Fever: A Review of Cleaning and Disinfection Procedures in Commercial Pig Holdings. *Res. Vet. Sci.* 2020, *132*, 262–267. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.009.
- *51. ASTM E1053-20*; Standard Practice to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces. Book of Standards, (2020), *11.08*, 7 Developed by Subcommittee: E35.15,DOI: 10.1520/E1053-20.

TRASPORTO DEL SUINO: TRA BENESSERE, ASPETTI ECONOMICI E DI QUALITA' DELLA COSCIA

TRANSPORT OF PIGS: WELFARE, ECONOMICAL TRAITS AND HAM QUALITY

SCOLLO A.¹, CONTIERO B.², BENATTI D.³, GOTTARDO F.²

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO); ²Dipartimento MAPS, Università di Padova, Legnaro (PD); ³O.P.A.S soc. coop. agr., Carpi, MO

Parole chiave: trasporto, suino, benessere, economia, qualità della coscia, difetti della coscia *Keywords*: transport, pig, welfare, economics, ham quality, ham defects

RIASSUNTO

Oggigiorno, i suini vengono spostati almeno una volta nella loro vita per ragioni manageriali. Questo ha messo sotto i riflettori la questione del benessere animale durante gli spostamenti, oltre ad aspetti legati alla salubrità delle carni ed alla qualità della carcassa. Scopo del presente lavoro è investigare parametri di trasporto ed animal-based durante lo spostamento di suini pesanti verso gli impianti di macellazione. In totale, sono state coinvolte nello studio 134 partite di suini pesanti italiani provenienti da 93 ingrassi. Aspetti legati sia al trasporto (densità, rimorchio, bilico, mescolamento degli animali, indice temperatura/umidità, stalla di sosta, lunghezza del viaggio e autista), all'animale (lesioni ai visceri della corata ed agli unghielli) ed ai prosciutti (difetti) sono stati registrati. Animali mescolati sia al carico che allo scarico hanno mostrato una frequenza maggiore di lesioni agli unghielli rispetto a quelli mescolati meno (1,17 vs < 0,32% rispettivamente, P = 0,022). Gli animali che hanno sostato nella stalla di sosta hanno mostrato una frequenza maggiore di cosce con il difetto di venatura (3.8 vs 2.4%; P = 0.004), di ematomi (3.7 vs 2.8%; P = 0.043), di cotenne rosse (3.7 vs 1.1%; P = 0.004)P = 0.001) e di morsi (1.7 vs 0.5%; P = 0.001). Tuttavia, hanno anche mostrato una freguenza inferiore di petecchie emorragiche (0,4 vs 0,8%; P = 0.014) e di carni pale soft exudative (0,2 vs 0.5%; P = 0.013). Le cotenne rosse sono state più frequenti anche in caso di viaggio con assenza di confort termico (>0.72 vs 0.56%; P = 0.010). Considerando la somma totale di tutti i difetti, l'elemento fortemente influenzante si è dimostrato essere l'autista, a prescindere dalle caratteristiche del camion

ABSTRACT

Nowadays, pigs are moved at least once in their life for managerial reasons. This has pointed out the issue of animal welfare during travel, as well as aspects related to the quality of meat and carcass. The aim of this work is to investigate transport parameters and animals during the transport of heavy pigs towards the slaughterhouses. In total, 134 batches of Italian heavy pigs from 93 fattening sites were involved. Aspects linked both to transport (density, trailer, articulated lorry, mixing of animals, temperature/humidity index, lairgae, length of journey and driver), to the animal (injuries to the pluck and to the claws) and to the hams (defects) have been registered. Animals mixed at both loading and unloading showed a higher frequency of claw injury than those mixed less (1.17 vs <0.32%, respectively, P = 0.022). The animals that experienced the lairage showed a higher frequency of thighs with the vein defect (3.8 vs 2.4%; P = 0.004), of hematomas (3.7 vs 2.8%; P = 0.043), red rinds (3.7 vs 1.1%; P = 0.001), and bites (1.7 vs 0.5%; P = 0.001). However, they also showed a lower frequency of

hemorrhagic petechiae (0.4 vs 0.8%; P = 0.014) and *pale soft exudative* meats (0.2 vs 0.5%; P = 0.013). Red rinds were also more frequent in the case of travel with no thermal comfort (>0.72 vs 0.56%; P = 0.010). Considering the sum of all defects, the strongest influencing element proved to be the driver, irrespective of the characteristics of the truck.

INTRODUZIONE

Il trasporto su strada degli animali di interesse zootecnico rappresenta oggi una parte integrante del processo produttivo, sia per l'allevamento (movimentazione degli animali da un sito ad un altro, entro allevamento e tra allevamenti) o per la produzione finale della carne (movimentazione degli animali dalla stalla al macello). Oggigiorno, i suini vengono spostati almeno una volta nella loro vita, per ragioni che vanno dalla specializzazione del sito produttivo, per le dimensioni che cambiano durante la crescita, per aspetti riproduttivi e, in alcuni casi, per fiere e show (Smith et al., 2004). La continua implementazione degli impianti di allevamento e di macellazione ha portato ad una sempre maggiore distanza tra i diversi siti, e dunque a maggiori tempi di percorrenza su strada (Speer et al., 2001). In più, motivazioni economiche legate alla maggiore convenienza di un mercato piuttosto che un altro (anche al di fuori dei confini di Stato), hanno ulteriormente acuito le distanze ed i tempi di percorrenza. Questa evoluzione dei trasporti zootecnici ha messo sotto i riflettori la questione del benessere animale durante gli spostamenti, per poi porre attenzione anche sull'aspetto legato alla salubrità delle carni ed alla qualità della carcassa a seconda del tipo di esperienza di trasporto (Keeling, 2005; Marahrens et al., 2011). Questi tratti sono sottolineati anche dall'Organizzazione Mondiale per la Salute Animale (WOAH), che riconosce l'importanza di mantenere delle buone condizioni di benessere animale durante la tratta in camion, anche come requisito strettamente legato alla qualità delle carni: ciò che avviene durante il trasporto, infatti, è una variabile estremamente ampia e va considerata come un importante punto critico (Speer et al., 200; OIE, 2004; Broom, 2005). I dubbi legati al benessere animali sono incentrati principalmente sul potenziale stress durante il trasporto, esacerbato da possibili lesioni da movimentazione, affaticamento, limitato accesso all'alimento ed all'acqua, condizioni climatiche non ideali, esposizione a rumori e vibrazioni, e mescolamento di animali tra loro non familiari. Dal punto di vista sanitario invece, il trasporto può rappresentare un momento di trasmissione di patogeni, di insorgenza di difetti alla carcassa dovuti a traumi, o del verificarsi di difetti della carne (per esempio la dark firm dry sindrome, o la pale soft exudative; Speer et al., 2001). Sebbene ci siano diversi studi che focalizzano l'attenzione dei trasporti nel settore suinicolo, anche nel contesto del suino pesante (Nannoni et al., 2016; Vitali et al., 2021), mancano dati integrati che prendano in considerazione più aspetti del trasporto, come per esempio le caratteristiche del camion, l'autista, la portata, unitamente a dati sanitari ed economici degli animali, come per esempio le lesioni della carcassa e della coscia, e le lesioni ai visceri. Scopo del presente lavoro è cercare di investigare parametri di trasporto ed animal-based durante lo spostamento di suini pesanti verso gli impianti di macellazione, cercando eventuali correlazioni con parametri di benessere e produttivi (nonché economici) dell'animale.

MATERIALI E METODI

La raccolta dei dati è stata effettuata in uno dei più grossi macelli di suini d'Italia (O.P.A.S soc. coop. agr., Carpi, MO) tra giugno e settembre 2021. La macellazione è avvenuta per iugulazione a seguito di stordimento elettrico a livello delle tempie, e la velocità della linea di macellazione era di 6 secondi tra un suino ed il successivo. In totale, sono state coinvolte nello studio 134 partite di suini provenienti da 93 siti di ingrasso differenti, selezionati random, e dislocati nel nord Italia tra Emilia Romagna, Lombardia, Piemonte e Veneto. Ciascuna partita di animali era composta mediamente da 130 suini di peso vivo compreso tra i 160 ed i 175 kg e

di età superiore a 9 mesi di vita, come richiesto dal disciplinare per la produzione di prosciutti DOP (disciplinare del Consorzio di Parma).

Condizioni legate al traporto

Per ciascun lotto di animali, sono state registrate alcune caratteristiche strettamente legate al trasporto ed al camion utilizzato:

- densità di trasporto, gli animali sono stati suddivisi in tre classi, calcolando la differenza tra la portata massima del camion (m² a disposizione * 235 kg, come da Reg. 1/2005) ed i kg realmente trasportati (gruppo densità alta = delta ≤0 kg; bassa = delta >0 e ≤1000 kg; bassissima = delta >1000 kg);
- Carico dal rimorchio e trasferimento degli animali nella motrice attraverso il ponte di comunicazione (dato binomiale: si/no);
- Trasporto su bilico (dato binomiale: si/no);
- Mescolamento degli animali, gli animali sono stati suddivisi in tre classi: assenza di mescolamento tra animali non familiari tra loro, mescolamento al carico oppure allo scarico, mescolamento sia al carico che allo scarico;
- Indice THI (*Temperature Humidity Index*), ottenuto tramite la formula di Kliber (1964), suddividendo i viaggi in quattro classi di condizione termica: lieve disagio 68<THI<72; disagio 72<THI<75; allerta 75<THI<79; pericolo THI>79;
- Permanenza nella stalla di sosta, nel caso in cui gli animali siano arrivati il giorno precedente la macellazione e dunque abbiano sostato la notte nelle strutture di sosta del macello (dato binomiale: si/no);
- Lunghezza del viaggio, gli animali sono stati suddivisi in tre classi a seconda del chilometraggio percorso dal camion dall'allevamento al macello: viaggio breve <50 km; medio ≥50 km, <140 kg; lungo ≥140 km;
- Autista, indicato con numero univoco ma anonimo per tutelare la privacy. Soltanto gli autisti che hanno effettuato almeno 3 viaggi da almeno 3 diverse aziende di provenienza sono stati inclusi nella valutazione.

Parametri animal-based

Per quanto riguarda i parametri *animal-based* invece, sono stati raccolti per ciascuna partita di suini:

- Lesioni ai piedi ed ulcera della suola, con uno score da 0 a 3;
- Lesioni polmonari con score Madec e punteggio da 0 a 24 valutato su 6 lobi polmonari (Scollo et al., 2017);
- Lesioni pleuriche con griglia SPES (Dottori et al., 2007), con score da 0 a 4;
- Lesioni al fegato, con score da 1 a 3 in base al numero di *milk spots* attribuibili ad *Ascaris suum* (Scollo et a., 2017);
- Lesioni al pericardio (dato binomiale: si/no, Bottacini et al., 2021).

Le rilevazioni sono state effettuate da personale formato appositamente in catena per la raccolta dati, nella figura di n. 2 operatori che si sono alternati sulla piattaforma di osservazione.

Parametri di qualità della coscia

Sono stati registrati tutti i difetti principali della coscia codificati secondo i dettami dei disciplinari di produzione Parma e San Daniele. Se in una coscia erano presenti più difetti, è stato registrato il difetto principale. La classificazione è stata effettuata da operatori professionisti dipendenti del macello durante la loro normale attività lavorativa.

Per l'analisi statistica è stata utilizzata le procedure NPAR OneWay di SAS dove il lotto di animali era l'unità sperimentale.

RISULTATI

Parametri animal-based

Il trasferimento degli animali dal rimorchio alla motrice, ed il trasporto su bilico non hanno influenzato alcun parametro legato benessere. Il parametro osservato sulle carcasse maggiormente dipendente da fattori legati al trasporto è emerso essere quello delle lesioni gravi agli unghielli (score 3), più frequente in caso di mescolamento degli animali. Infatti, animali non mescolati oppure mescolati soltanto una volta presentano percentuali molto basse (<0,32) di lesioni di grave entità ai piedi in confronto ai casi di partite di suini che subivano dei mescolamenti sia al carico che allo scarico (0,32 e 0,00 vs 1,17% rispettivamente, P-value = 0,022). Nessun altro parametro sanitario è stato influenzato dalle variabili legate al trasporto.

Parametri di qualità della coscia

Gli unici parametri legati al traporto che hanno influenzato l'incidenza di alcuni specifici difetti delle cosce sono stati la permanenza nella stalla di sosta, e l'autista. Nel primo caso, infatti, gli animali arrivati presso gli impianti di macellazione il giorno precedente alla processazione hanno mostrato una frequenza maggiore di cosce con il difetto di venatura (3.8 vs 2.4%; P-value = 0,004), di ematomi (3,7 vs 2,8%; P-value = 0,043), di cotenne rosse (3,7 vs 1,1%; P-value = 0,001) e di morsi (1,7 vs 0,5%; P-value = 0,001, figura 1). Tuttavia, gli animali che hanno sostato nella stalla di sosta durante la notte hanno mostrato una freguenza inferiore di petecchie emorragiche (0.4 vs 0.8%; P-value = 0.014) e di carni pale soft exudative (0.2 vs 0.5%; P-value = 0.013). Le cotenne rosse sono state più frequenti anche in caso di viaggio con assenza di confort termico (>0.72 vs 0.56%; P-value = 0.010). Considerando invece la somma totale di tutti i difetti, l'elemento fortemente influenzante si è dimostrato essere l'autista, a prescindere dalle caratteristiche del camion. Gli autisti che hanno effettuato almeno 3 viaggi da almeno 3 diversi allevamenti tra le partite oggetto di controllo sono stati 16. Il miglior autista ha guidato verso il macello delle partite di animali dai quali poi è stato ottenuto l'8,7% di difetti totali dalle cosce. Il peggiore invece, ha portato al macello partite che hanno originato una percentuale di difetti delle cosce del 26,4%.

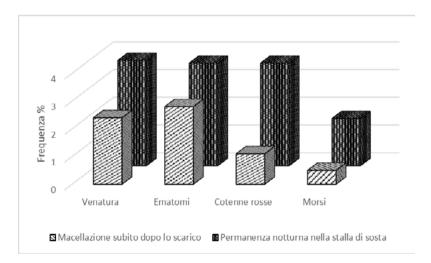


Figura 1. Frequenza percentuale dei difetti della coscia che sono svantaggiati dalla sosta notturna nella stalla di sosta prima della macellazione. P-value < 0,05.

Figure 1. Frequency of ham defect that worsened after lairage at the slaughterhouse before slaughtering. P-value < 0.05.

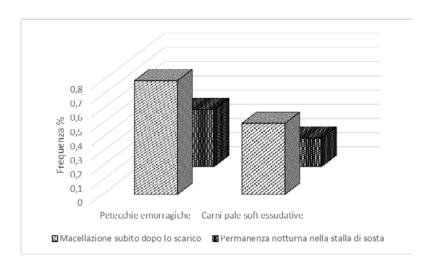


Figura 1. Frequenza percentuale dei difetti della coscia che beneficiano dalla sosta notturna nella stalla di sosta prima della macellazione. P-value < 0,05.

Figure 1. Frequency of ham defect that improved after lairage at the slaughterhouse before slaughtering. P-value < 0.05.

DISCUSSIONE

Il riscontro di numerosi difetti dei prosciutti collegati ad alcuni aspetti specifici degli spostamenti su strada fa emergere l'importanza di un buon trasporto non soltanto per garantire il benessere animale ma anche per un riscontro economico. La coscia del suino pesante italiano rappresenta infatti la quota maggiore di guadagno per chi alleva suini, e qualsiasi difetto rischia di fare declassare questo taglio a categorie di qualità inferiore, e dunque anche meno remunerate. Dal punto di vista del benessere animale, sebbene il presente studio non abbia approfondito alcuni importanti aspetti legati alle lesioni della cute o della coda (peraltro già confermati da altri studi, Vitali et a., 2021), è emersa una frequenza maggiore di lesioni gravi agli unghielli in caso di mescolamento di animali non familiari tra loro sia al carico che allo scarico. Questo risultato riflette i comportamenti spesso aggressivi e di conflitto che si osservano frequentemente in caso di incontro tra animali che non si conoscono, anche se ciò avviene durante il trasporto, e nelle fasi di carico e scarico (Vitali et al., 2017). Le lesioni agli unghielli possono originare dai combattimenti che gli animali effettuano in condizioni di sovraffollamento o di pavimentazione poco idonea, che spesso è presente sui camion nelle aree di movimentazione degli animali. Di frequente, ad essere responsabili di lesioni agli unghielli e conseguenti zoppie sono le cadute, gli scivolamenti, ed i movimenti inconsueti che vengono effettuati dagli animali e che comportano un affaticamento muscolare (Grandin, 2014). Ad essere però allarmante, è l'evidenza che la scarsità di benessere nelle fasi del trasporto e che precedono la macellazione possa essere associata anche a perdite economiche legate ai difetti più frequenti dei prosciutti. In primis, la permanenza notturna degli animali nella stalla di sosta sembra essere un fattore di rischio per alcuni difetti, con l'aumento di alcuni di essi. Certamente, l'aumento di ematomi e di morsi può essere legato al fatto che la permanenza stessa possa aver dato modo agli animali, che si sono trovati in un ambiente nuovo e stressati dal viaggio, di interagire negativamente tra di loro. Tuttavia, una riflessione va fatta sul fatto che anche i difetti della venatura e delle cotenne rosse, entrambi associati a possibili stress dell'animale, siano aumentati durante la sosta notturna in stalla. La permanenza nella stalla di sosta era già stata investigata da altri autori per parametri differenti. Vitali et al.

(2021) avevano già evidenziato una maggiore frequenza di ascessi e strappi muscolari negli animali che sostavano negli impianti di macellazione durante la notte, così come erano state registrate più lesioni alla coda. Gottardo et al. (2017) invece avevano registrato un aumento di animali con ulcera gastrica. Entrambi gli studi hanno ipotizzato il coinvolgimento di alcuni fattori legati allo stress degli animali che sostano nella stalla notturna, oppure a processi infiammatori e liberazione di istamina per il peggiorare di condizioni infettive o traumatiche pregresse (sebbene nel presente studio non siano emerse differenze nelle lesioni ai visceri, probabilmente perché espressione di condizioni più croniche rispetto al trasporto). La sosta nella stalla però ha anche fatto diminuire altri difetti, la cui incidenza è peraltro decisamente inferiore rispetto ai lavori precedentemente citati, ovvero quello delle petecchie emorragiche e delle carni pale soft exudative. Entrambi questi difetti sembrano essere correlati a stati di ipereccitazione muscolare, spesso legata e scatenata proprio dal trasporto, e probabilmente un periodo di fermo notturno permette all'animale di ristabilire il proprio equilibrio eccitativo prima della macellazione. Tuttavia, la percentuale di difetti a svantaggio della stalla di sosta è maggiore rispetto a quella a vantaggio.

Riguardo a tutti gli altri elementi del trasporto presi in considerazione, il principale fattore di rischio è rappresentato dall'autista del mezzo. È risaputo in letteratura che il ruolo della figura dell'autista è fondamentale anche per il benessere dei suini. Un buon carico/scarico degli animali è strettamente dipendente dalla preparazione e formazione degli operatori. Sebbene sia vero che un altro fattore strettamente dipendente ad un buon carico/scarico degli animali sia anche l'ambiente di lavoro; aziende che non possiedono una buona piazzola di carico/scarico metteranno in difficoltà gli operatori, diminuendo la loro efficienza lavorativa. Nel presente studio ciascun autista è stato valutato su più aziende proprio per evitare di attribuirgli delle responsabilità che non ha, ma dalle elaborazione dei dati emerge chiaramente come il fattore "autista" sia importante anche a prescindere dall'ambiente in cui opera. Spesso la causa si può trovare nelle tempistiche ristrette che i carichi richiedono agli operatori, che devono movimentare un lotto da 130 animali nel minor tempo possibile, spesso tra i 30 e 120 minuti. Questo non sempre incontra la necessità del suino di osservare l'area verso la quale si sta dirigendo, esplorando i dintorni prima di camminare (Wood-Gush and Vestergaard, 1991). Inevitabilmente questo spinge l'operatore a forzare l'animale, talvolta con l'utilizzo di strumenti più o meno coercitivi (esempio, la pila elettrica), portando gli animali a comportamenti di stress evidente e di paura, instaurando un circolo vizioso di eventi che prolungano ulteriormente le operazioni di carico/scarico (esempio, animali che cercano di tornare verso l'allevamento o che si scavalcano, Hemsworth, 2019). Anche una eccessiva pressione del luogo di lavoro (per esempio del macello stesso che impone orari rigidi) può peggiorare l'efficienza lavorativa degli autisti (Ghasemi et al., 2020). La legislazione in vigore richiede che gli autisti siano formati ed abbiano ottenuto un certificato o patentino che li prepari riguardo la gestione dei veicoli, degli animali e degli ambienti (Reg. 1/2005). Tuttavia, la necessità di una formazione aggiuntiva e specifica per la gestione degli animali è stata identificata già da tempo (Herskin et al., 2017) per aumentare le competenze relative alla specie animale trasportata. Inoltre, il ruolo stesso dell'autista è riconosciuto essere logorante e stressante, e perciò predisponente ad atteggiamenti di nervosismo da parte dell'operatore. Traffico, incidenti su strada, azioni ripetitive e monotone, posizioni scomode e protratte nel tempo alla guida ma anche durante il carico/scarico, sono tutti fattori che anche dal punto di vista psicologico possono mettere a dura prova il lavoro quotidiano della figura dell'autista aumentando il suo carico di lavoro.

In conclusione, l'autista sembra avere un ruolo chiave per il benessere dell'animale ma anche per la redditività del lotto di suini che lui stesso trasporta verso gli impianti di macellazione. Un occhio di riguardo deve necessariamente essere dedicato alla sua formazione, ed al monitoraggio delle difettosità dei suini trasportati, anche come metodo di valutazione nel

tempo del suo operato. Dal lato del macello invece, una riflessione particolare va fatta nei confronti della stalla di sosta, che rappresenta un fattore di rischio per la frequenza di diversi difetti della coscia, ed un fattore protettivo per altri difetti.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Bottacini, M., Scollo, A., Contiero, B., Mazzoni, C., Pace, V., & Gottardo, F. (2021). Prevalence of fibrinous pericarditis in heavy pigs (170 kg) and its association with other pluck lesions at slaughter inspection. The Veterinary Journal, 273, 105680.
- 2. Broom, D. M. (2005). The effects of transport on animal welfare. Scientific and Technical Review, World Organization for Animal Health, 24, 683–691.
- 3. Dottori, M., Nigrelli, A. D., Bonilauri, P., Merialdi, G., Gozio, S., & Cominotti, F. (2007). Proposal for a new grading system for pleuritis at slaughterhouse. The SPES (Slaughterhouse Pleuritis Evaluation System) grid. Large Animal Review, 13(4), 161-165.
- 4. Ghasemi, N., Acerra, E., Vignali, V., Lantieri, C., Simone, A., & Imine, H. (2020). Road Safety Review update by using innovative technologies to investigate driver behaviour. Transportation research procedia, 45, 368-375.
- Gottardo, F., Scollo, A., Contiero, B., Bottacini, M., Mazzoni, C., & Edwards, S. A. (2017). Prevalence and risk factors for gastric ulceration in pigs slaughtered at 170 kg. Animal, 11(11), 2010-2018.
- 6. Grandin T. Livestock Handling and Transport, 4th ed.; Grandin T., Ed.; CABI Publishing: Wallingford, UK, 2014; pp. 329–348. https://doi.org/10.1079/9781780643212.0000.
- 7. Hemsworth, P. H. (2019). Behavioural principles of pig handling. In Livestock handling and transport (pp. 290-306). Wallingford UK: CABI.
- 8. Herskin, M. S., Hels, A., Anneberg, I., & Thomsen, P. T. (2017). Livestock drivers' knowledge about dairy cow fitness for transport—A Danish questionnaire survey. Research in veterinary science, 113, 62-66.
- 9. Keeling, L. J. (2005). Healthy and happy: Animal welfare as an integral part of sustainable agriculture. Ambio, 34, 316–319.
- 10. Kibler, H. H. (1964). Environmental physiology and shelter engineering with special reference to domestic animals. LXVII, Thermal effects of various temperature-humidity combinations on Holstein cattle as measured by eight physiological responses.
- 11. Marahrens, M., Kleinschmidt, N., Di Nardob, A., Velardec, A., Fuentesc, C., Truara, A., et al. (2011). Risk assessment in animal welfare—Especially referring to animal transport. Preventive Veterinary Medicine, 102, 157–163.
- 12. Nannoni, E., Liuzzo, G., Serraino, A., Giacometti, F., Martelli, G., Sardi, L., ... & Ostanello, F. (2016). Evaluation of pre-slaughter losses of Italian heavy pigs. Animal Production Science, 57(10), 2072-2081.
- 13. OIE (2004). World Organization for Animal Health. Global Conference on animal welfare: An OIE initiative. Paris. 23–25 February [Online] Available: www.oie.int/eng/Welfare 2004/home.htm.
- 14. 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.
- 15. Smith, G. C., Grandin, T., Friend, T. H., Lay, D., & Swanson, J. C. (2004). Effect of transport on meat quality and animal welfare of pigs, sheep, horses, deer and poultry. Available at: http://www.grandin.com Accessed 18 Febbraio 2023.
- 16. Speer, N. C., Slack, G., & Troyer, E. (2001). Economic factors associated with livestock transportation. Journal of Animal Science, 79, E166–E170.

- 17. Vitali M, Conte S, Lessard M, Deschêne K, Benoit-Biancamano MO, Celeste C, et al. Use of the spectrophotometric color method for the determination of the age of skin lesions on the pig carcass and its relationship with gene expression and histological and histochemical parameters. J Anim Sci. 2017; 95:3873–3884.
- 18. Vitali, M., Bosi, P., Santacroce, E., & Trevisi, P. (2021). The multivariate approach identifies relationships between pre-slaughter factors, body lesions, ham defects and carcass traits in pigs. PLoS One, 16(5), e0251855.
- 19. Wood-Gush, D. G. M., & Vestergaard, K. (1991). The seeking of novelty and its relation to play. Animal Behaviour, 42(4), 599-606.

PREVALENZA E GRAVITÀ DI LESIONE ALLA CODA E FREQUENZA DI ASCESSI E DIFETTI NELLE CARCASSE DI SUINI SOTTOPOSTI O NO A CAUDOTOMIA

PREVALENCE AND SEVERITY OF TAIL LESIONS AND FREQUENCY OF ABSCESSES AND DEFECTS ON PIG CARCASSES SUBJECTED OR NOT TO TAIL DOCKING

TREVISI P.1, LUISE D.1, VIRDIS S.1, DALCANALE S.1, ROLLA U.2

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari - DISTAL, Università di Bologna; ² Gruppo Martini

Parole chiave: lesioni alla coda, macello, ascessi *Keywords*: tail lesions, slaughterhouse, abscesses

RIASSUNTO

L'obbiettivo di questo studio è stato di valutare l'effetto della non applicazione della caudotomia su prevalenza e gravità delle lesioni alla coda, frequenza di ascessi e di difetti alle cosce di carcasse di suini al macello. I dati sono stati raccolti tra aprile e settembre 2022 da 45 partite (5216 suini). Le lesioni alla coda sono state valutate utilizzando uno punteggio a tre classi (0-2), secondo il protocollo Welfare Quality® (2009). Gli ascessi sono stati registrati sulla linea di macellazione, mentre i difetti delle cosce sono stati valutati e forniti dal macello. I dati evidenziano che il Lesion Score Index (LSI) della coda è risultato più alto nelle partite di suini a coda non tagliata (P<0,0001). Le carcasse di suini a coda integra hanno presentato una frequenza più alta di difetti alla coscia (ematomi e petecchie) e artriti (P<0,0001). Non è stata riscontrato alcun effetto del taglio della coda sulla frequenza di ascessi. È stata osservata una correlazione positiva tra l'aumento di LSI ed i difetti alla coscia quali ematomi (r=0.51) e petecchie (r=0.64) e la frequenza di artriti (r=0.56). In conclusione, il nostro dataset mostra che la caudotomia risulta essere efficace nel prevenire il rischio di lesioni severe alla coda. Mentre, seppur presente una correlazione tra lunghezza della coda, difetti della coscia e artriti, queste problematiche possono essere correlate ad altri fattori di rischio. La lunghezza della coda, non influenza la frequenza di ascessi.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the implication of the presence of entire tail on the prevalence and severity of tail lesions, abscess frequency and thigh defects in pig carcasses at slaughter. For this purpose, a total 5216 caraccas belonged to 45 batches were inspected in the slaughterhouse between April and September 2022. Tail lesions severity was scored from 0 to 2 according to the Welfare Quality® (2009) protocol and *Lesion Score Index* calculated (LSI). Abscesses were counted while the defects of the thigh were evaluated by slaughterhouse staff. The LSI was higher in undocked tail pigs (P<0.0001). Furthermore, a higher frequency of both thigh lesions (hematomas and petechiae) and arthritis was found in carcasses of undocked pigs (P<0.0001). No difference in the abscess frequency was observed between docked or undocked carcasses. A positive correlation was observed between the increase of LSI and thigh defects such as hematomas (r=0.51) and petechiae (r=0.64) and the frequency of arthritis (r=0.56). In conclusion, the absence of caudectomy appears a risk factor for the prevalence of tail lesions. Although there is

a correlation between tail length, ham defects and arthritis, these two problems may be related to other risk factors. Tail length, on the other hand, does not appear to be correlated with the presence of abscesses.

INTRODUZIONE

L'osservazione delle lesioni della carcassa in macello è considerata un'opportunità per misurare lo stato di benessere degli animali prima del loro arrivo (Teixeira et al., 2016). In particolare, il monitoraggio delle lesioni della pelle e della coda sulle carcasse si è rivelato un utile strumento per la valutazione della salute e del benessere in allevamento, evidenziando il loro potenziale utilizzo come indicatori dei possibili fattori di rischio durante l'intero ciclo produttivo del suino (Van Staaveren et al., 2016).

Le lesioni della coda, considerate oggi uno degli indicatori "iceberg" principali per identificare problemi riguardanti lo stato di benessere dei suini in allevamento, derivano da un comportamento alterato, che può essere favorito da molteplici fattori, tra cui, condizioni di stress durante la fase di allevamento e trasporto (EFSA, 2007). Le lesioni da morso della coda, specialmente se severe, possono comportare una perdita in carne a seguito della necessità di rifilatura della carcassa (Van Staaveren et al., 2016).

Soprattutto per i circuiti DOP, i difetti delle cosce hanno un interesse economico rilevante. Le lesioni ed i difetti riscontrati a carico delle sono spesso di origine traumatica; comunemente dovute a combattimenti, che si verificano quando diversi gruppi di suini vengono mescolati, come accade prima o dopo il carico per il trasporto al macello (Bottacini et al., 2018). Inoltre, lo stress causato dal trasporto, il digiuno, il tempo prolungato di stabulazione e le condizioni ambientali possono influenzare negativamente il comportamento dei suini, con conseguente aumento dei danni alla pelle (Bottacini et al., 2018). Un altro tipo di difetti che devono essere monitorati sono gli ascessi nelle diverse zone della carcassa. In base alla loro collocazione e dimensione, possono costituire una seria perdita economica per la filiera suinicola dovuta sia alla rifilatura della carcassa ma altresì alla sua esclusione dal commercio.

Secondo alcuni autori, tra le cause di insorgenza di ascessi vi sono le lesioni alla coda (Kritas and Morrison., 2017). Infatti, lesioni profonde alla coda potrebbero fornire un punto di ingresso per i batteri.

L'obbiettivo di questo studio è stato di valutare, al macello, la prevalenza di lesioni alla coda, di ascessi e difetti alla coscia in suini sottoposti o no a caudotomia, indagando l'eventuale correlazione tra i diversi parametri in studio.

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 aprile e settembre 2022, in un unico macello. Le osservazioni sono state svolte in 9 giornate. Sono state valutate complessivamente 45 partite, di cui 23 a coda tagliata e 22 a coda lunga per un totale di 5216 carcasse provenienti da allevamenti scelti casualmente. Sulle partite sono stati valutati i seguenti parametri: lesioni alla coda, ascessi in diversi punti della carcassa, artriti e difetti o lesioni della coscia.

Le partite sono state divise in base alla data di macellazione. Per ogni mese le osservazioni sono state effettuate a inizio e fine mese in modo da ottenere una valutazione maggiormente rappresentativa della filiera produttiva.

Le lesioni alla coda sono state valutate utilizzando uno punteggio a tre classi (da 0 a 2), secondo il protocollo proposto da Welfare Quality® (2009), come descritto in Tabella 1.

Tabella 1. Griglia utilizzata per la valutazione delle lesioni alla coda **Table 1.** Grid for tail lesions evaluation

Punteggio code	Lesione
0	Nessuna lesione
1	Morso superficiale, nessun'evidenza di tumefazione
2	Lesione aperta sulla coda, presenza di cicatrizzazione, tumefazione o parziale assenza della coda

I risultati di ciascuna partita sono stati espressi come prevalenza dei punteggi ottenuti (0, 1, 2). È stato successivamente calcolato un indice di lesione denominato Lesion Score Index (LSI) secondo la seguente formula:

[% di lesioni tipo 1 + (2*% lesioni tipo 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 indica che tutte le carcasse nel lotto mostrano lesioni gravi.

Gli ascessi rilevati durante le osservazioni in macello sono stati raggruppati in 3 categorie, come descritto in Tabella 2.

Tabella 2. Griglia utilizzata per localizzare e raggruppare gli ascessi sulle mezzene **Table 2.** Grid for abscesses position and grouping

Posizione ascesso	Gruppo				
	Coscia	Colonna	Totali		
Muscoli iliaci		X			
Colonna torace		X			
Coscia interna	X				
Coscia/inguine	X				
Gola (linfonodi)			Х		
Linfonodo toracico			X		
Cute addome			Х		
Sterno/coste			Х		
Sopra coda		X			
Base coda		X			
Vertebra toracica		X			
Vertebre sacrali		X			
Vertebre coccigee		X			
Basso addome					
Ombelico			Х		
Collo			Х		
Pleura			X		

Il personale del macello ha raccolto i dati relativi ai difetti delle cosce quali, frequenza ematomi, frequenza petecchie e venature, frequenza PSE, frequenza artriti e frequenza sottopeso. I dati relativi distanza tra macello e allevamento sono stati forniti dalla filiera. I risultati sono espressi come frequenza media della singola partita.

STATISTICA

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software R (R Core Team, 2017). La partita è stata utilizzata come unità statistica. I dati sono stati analizzati utilizzato un modello general linear model (GLM) e Anova che includeva il tipo di coda (corta vs lunga) e la data del rilevamento (bilanciata per tipologia di coda) e la distanza dell'allevamento al macello. La distanza dell'allevamento è stata in seguito esclusa dal modello in quanto non significativa. La correlazione tra le frequenze di ascessi e lesioni alla coda e difetti è stata testata utilizzando le correlazioni di Pearson (pacchetto Hmisc in R) nel dataset completo. Valori con un $P \le 0,05$ sono stati considerati significativi mentre con un $0.10 \le P > 0,05$ è stato considerato una tendenza.

RISULTATI

I dati relativi all'effetto della lunghezza della coda sui dati rilevati sono riportati in Tabella 3. Il LSI medio delle code è risultato maggiore nei suini a coda non tagliata (P<0,0001) così come la frequenza di ematomi, petecchie e venature della coscia e le artriti sono risultate maggiori nei suoni a coda lunga (P<0,0001). Non si è invece evidenziato alcun effetto della lunghezza della coda sulla frequenza di ascessi sulla carcassa per nessuna delle aree considerate (P>0.05), così come non è risultata significativa la frequenza di carcasse con carne PSE o di animali sottopeso rispetto alla tipologia di coda.

Tabella 3. Effetto della lunghezza della coda sul Lesion Score Index della coda, numero di ascessi e difetti della coscia.

Table 3. Effect of type of tail on the Lesion Score Index of tail, abscesses number and ham defects.

Parametro	Coda*		SEM	P-value
	С	L		
LSI, coda	93.5	176.5	5.5	<0.0001
Frequenza ascessi	2.03	2.81	0.35	0.11
Frequenza ascessi cosce	0.64	0.98	0.24	0.31
Frequenza ascessi colonna	0.4	0.45	0.15	0.79
Frequenza ematomi	8.06	14.57	1.03	<0.0001
Frequenza petecchie e venature	2.49	15.65	1.68	<0.0001
Frequenza PSE	2.77	4.89	2.41	0.52
Frequenza artriti	0.49	2.26	0.27	<0.0001
Frequenza sottopeso	1.81	2.34	0.7	0.57

^{*} L = Coda lunga; C = Coda tagliata; ¹LSI: Lesion Score Index;

In Figura 1 sono riportati i dati delle correlazioni tra diversi parametri. Sono emerse correlazioni positive tra la frequenza di ascessi totali e la frequenza di ascessi alle cosce (P<0.0001; r= 0.71), la frequenza degli ascessi totali e quelli alla colonna (P<0.0001; r=

0.43), LSI e frequenza di ematomi (P<0.0001; r=0.51), frequenza ascessi totali e frequenza ematomi (P= 0.04; r=0.33), LSI e frequenza di petecchie e venature (P<0.0001; r=0.64), frequenza di ematomi e frequenza di petecchie e venature (P<0.0001; r=0.51), frequenza ascessi alle cosce e PSE (P<0.0001; r=0.35), LSI e frequenza di artriti (P<0.0001; r=0.56), frequenza di ematomi e quella delle artriti (P=0.07; r=0.29), frequenza di petecchie e venature e quella delle artriti (P=0.04; r=0.34). Mentre non si è osservata nessuna correlazione tra LSI e ascessi sulla carcassa.

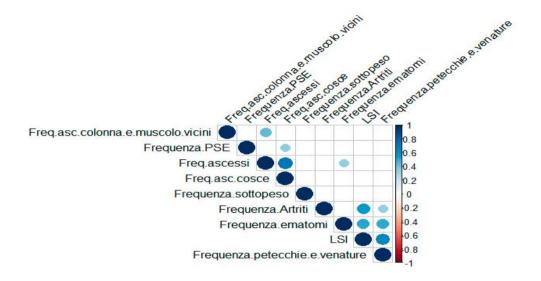


Figure 1. Intensità e direzione delle correlazioni tra i parametri rilevati **Figure 1.** Intensity and direction of the correlation between the collected parameters.

DISCUSSIONE

I dati raccolti evidenziano una maggiore severità di lesioni gravi in soggetti a coda non tagliata. L'assenza di caudotomia, infatti ha visto un aumento statisticamente significativo del LSI rispetto agli animali a coda corta. Questo dato è in accordo con i risultati di altri studi, che fanno riferimmo a filiere italiane o straniere (Henry et al., 2002; Scollo et al., 2016). Nelle condizioni di allevamento dei suini considerati in questo studio, la coda lunga pare rappresentare un fattore di rischio sia per il benessere del suino, sia per la qualità dei prodotti. Infatti i dati rilevati mostrano una maggiore frequenza di difetti dei prosciutti in suini a coda non tagliata, con un evidente impatto economico negativo sulla filiera. Le lesioni a testa, collo, orecchie e fianchi derivano prevalentemente dalle lotte gerarchiche o da condizioni peculiari qual è il rimescolamento dei gruppi o situazioni di stress riconducibili a variazioni repentine di temperatura, umidità, o rumori forti ed imporvisi (Dalla Costa et al., 2017; Kongsted and Sørensen., 2017). Considerando che le osservazioni al macello, non consento di determinare con precisione la tempistica di comparsa delle lesioni, e considerando che alcune delle lesioni osservate sia alla coda, e dei difetti ai prosciutti, possono essere originati poco prima della macellazione, si devono comunque tenere in considerazione, quali possibili fattori di rischio ulteriori, sia il trasporto sia il tempo di attesa pre-macellazione, fattori al momento non considerati in questo studio. Oltre ai difetti dei prosciutti, è stata rilevata un maggiore presenza di artriti nei suini a coda non tagliata, questo dato non trova altri risconti in bibliografia. È

possibile ipotizzare che la presenza di lesioni severe è fonte di stress e di conseguenza di un possibile stato di immunosoppressione

che può facilitare l'insorgenza di artriti di origine infettiva (Jensen and Toft., 2009).

La presenza di lesioni alla coda è stata spesso associata ad un maggiore rischio di esclusione dal commercio di parte o in toto della carcassa (Valros et al., 2004). Per quanto riguarda gli ascessi totali, alla coscia ed alla colonna, nel presente studio non è stata osservata alcuna associazione tra la loro frequenza e la tipologia di coda, tagliata o non. Non avendo reperito altri dati relativi al confronto della presenza di ascessi al macello tra suini sottoposti a caudotomia e non, non è possibile eseguire un confronto diretto con studi simili. Tuttavia, lo studio di campo condotto da Scollo (2019) mostra che in suini a coda non tagliata si ha un aumento di lesioni alla coda e di eventi di morsicatura acuti che portano a mieliti ed infezioni ascendenti lungo la colonna vertebrale, che, secondo gli studio di Huey., (1996) e Kritas and Morrison. (2007) possono portare ad una maggiore presenza di ascessi e di esclusione della carcassa dal commercio, condizione non osservata nel nostro dataset.

Approfondendo le correlazioni tra i parametri analizzati, è stato possibile rilevare che i parametri maggiormente influenzati dall'assenza di caudotomia (LSI, artriti, ematomi, petecchie e venature della coscia) sono correlati positivamente tra loro, tuttavia, i coefficienti relativamente bassi, indicano il coinvolgimento di altri fattori nell'insorgenza di tali relazioni.

CONCLUSIONI

In conclusione, la non applicazione del taglio coda può essere considerato uno dei fattori di rischio per la prevalenza di lesioni alla coda e la loro gravità, seppure il solo rilevamento al macello non permette di determinarne la dinamica di comparsa, limitando di fato l'interpretazione di altri dati rilevanti quali i difetti alle cosce e le artriti. Nonostante ciò, resta evidente che la maggiore lunghezza della coda, nelle condizioni di allevamento dei suini considerati in questo studio rappresenta un fattore di rischio nella fase che va dall'allevamento allo stordimento al macello. Per quanto riguarda la domanda principale cui voleva rispondere lo studio, nel nostro dataset gli ascessi, non sono risultati essere associati alla tipologia di coda ed alla severità delle lesioni. Ulteriori dati relativi al trasporto, ai tempi di sosta pre-macellazione ed ai giorni di allevamento medi delle partite, potrebbero essere utili per migliorare la definizione dell'analisi svolta nella comprensione dell'effetto dell'assenza di caudotomia nel suino pesante destinanti alle produzioni d prosciutti DOP.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Gruppo Martini per aver concesso l'accesso al macello ed avere condiviso i dati di macellazione. Si ringrazia inoltre il Progetto WELLDONEPIG R.E.R.* 16.1.01 – FA 3A (determinazione N17611 - 30/09/2019) PSR Regione Emilia-Romagna.

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).
- 2. Dalla Costa FA, Lopes LS, Dalla Costa OA. Effects of the Truck Suspension System on Animal Welfare, Carcass and Meat Quality Traits in Pigs. *Animals*. 2017; 7(1):5.
- 3. 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.
- 4. Henry M., Jansen H., Amezcua M.R., O'Sullivan T.L., Niel L., Shoveller A.K., Friendship

- R.M. (2021). "Tail-Biting in Pigs: A Scoping Review". Animals. 11(7):2002.
- 5. Huey R.J. (1996). "Incidence, location and interrelationships between the sites of abscesses recorded in pigs at a bacon factory in Northern Ireland". Vet Rec. 25;138(21):511-4.
- 6. Jensen, T. B. and Toft, N. (2009). "Causes of and predisposing risk factors for leg disorders in growing-finishing pigs." CABI Reviews. CABI International.
- 7. Kongsted H., Sørensen J.T. (2017). "Lesions found at routine meat inspection on finishing pigs are associated with production system". The Veterinary Journal, 223, 2017, 21-26.
- 8. Kritas S.K., Morrison R.B. (2007). "Relationships between tail biting in pigs and disease lesions and condemnations at slaughter". Vet Rec. 160(5):149-52.
- 9. Scollo A, Contiero B, Gottardo F. Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170 kg live weight. The Veterinary Journal, 207, 2016. 92-98
- 10. Scollo A. Interrompere il taglio della coda: una decisione delicata. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini 2019, 25-26.
- 11. Teixeira DL., 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. Valros A., Ahlström S., Rintala H., Häkkinen T., Saloniemi H. (2004). "The prevalence of tail damage in slaughter pigs in Finland and associations to carcass condemnations". *Anim Sci.* 54:213–9.
- 13. Van Staaveren N., Vale A.P., Manzanilla E.G., Teixeira, D.L., Leonard, F.C., Hanlon, A., Boyle, L.A. (2016) "Relationship between tail lesions and lung health in slaughter pigs". *Prev Vet Med.* 127, 21–26.

IMPORTANZA DEL MONITORAGGIO NEL TEMPO DELL'ANTIBIOTICO-SENSIBILITÀ' DEI PRINCIPALI PATOGENI DEL SUINO: 20 ANNI DI ESPERIENZA IN FILIERA

MONITORING OF ANTIBIOTIC-SENSITIVITY TROUGHOUT TIME OF THE MOST IMPORTANT SWINE PATHOGENS: 20 YEARS LONG EXPERIENCE OF A PIG PRODUCTION CHAIN

SANDRI G.1, GIOVANARDI D.2, ORTALI G.2, DALLA BONA M.1

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

Parole chiave: Suino, *Streptococcus suis, P.Multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae, E.Coli*, diagnosi di Filiera, Antibiotico-sensibilità

Keywords: Swine, Streptococccus suis, P.Multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae, E.Coli, Production chain-associated diagnosis, AB sensitivity.

RIASSUNTO

Gli autori presentano l'andamento della antibiotico- sensibilità nel tempo (2002-2022) di alcuni dei principali patogeni isolati negli ultimi 20 anni nei vari siti delle Filiere produttive del gruppo. Gli esiti del Laboratorio diagnostico Tre Valli- Gruppo Veronesi vengono organizzati in modo da monitorare l'attività dei principali antibiotici nei confronti di un pool di patogeni più frequentemente isolati nelle varie fasi produttive delle varie filiere per fornire ai veterinari che operano in campo indicazioni utili per un trattamento mirato e razionale.

ABSTRACT

The authors present the pattern of antibiotic- sensitivity troughout time (2002-2022) of the most frequently isolated pathogens in the different production-chains during the last 20 years. The reports issued from the officially recognized Laboratorio diagnostico Tre Valli- Veronesi Group are organized so that the antibiotic sensitivity of the most important pathogens, isolated at different stages of various pig flows, are constantly updated to provide useful information to the field veterinarians for a rational and targeted therapy.

INTRODUZIONE

Quello che è oggi il Laboratorio Diagnostico Tre Valli ha soddisfatto la necessità di arrivare a una diagnosi precisa ed integrata delle principali patologie riscontrate nella patologia suina di Filiera già a partire dall'inizio degli anni '80. Da sempre il Laboratorio Tre Valli ha fornito ai veterinari della Filiera produttiva suina de La Pellegrina/Gruppo Veronesi indicazioni preziose riguardo la antibiotico-sensibilità/resistenza dei patogeni isolati. A partire dall'anno 2002 si è deciso di organizzare queste informazioni in modo organico per avere una "visione nel tempo" dell'andamento dell'antibiotico sensibilità/resistenza dei principali patogeni batterici del suino isolati quali *Streptococcus suis*, *E.coli emolitico*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e altri. Siamo oggi arrivati a 21 anni di monitoraggio con diverse migliaia di isolamenti nel tempo che possono fornire preziose informazioni per un sempre più accurato e consapevole utilizzo degli antibiotici nell'allevamento di filiera.

MATERIALI E METODI

Il test di Kirby – Bauer (Metodo per diffusione) è una prova di sensibilità di un microrganismo

verso numerosi antibiotici su piastre di terreno solido mediante applicazione di antibiotici su terreno solido inoculato con il microrganismo da esaminare. Il terreno usato è il Mueller - Hinton . Successivamente all'isolamento e identificazione di un ceppo batterico mediante l'applicazione delle specifiche metodiche microbiologiche, si provvede alla semina per spatolamento di una sopensione batterica in purezza. Si applicano i dischetti con concentrazione nota di antibiotico in modo regolare sulla superfice. Si incuba overnight a 37 °C per 24 ore e successivamente si leggono i diametri di alone di inibizione. Il riferimenti sono relativi alle tabelle EUCAST. L'espressione del risultato è in tre classi Sensibile (S), Resistente (R) e Intermedio (I) sulla base del diametro dell'alone di inibizione. E' importante notare che le dimensioni degli aloni non hanno significato assoluto e non sono confrontabili tra antibiotici diversi essendo legati alle dimensioni della molecola e alle loro capacità di diffusione nel terreno.

Al fine di standardizzare il processo nel 2010 è stata implementata una procedura di lettura computerizzata degli aloni e produzione del report di sensibili AST. Si utilizza un' attrezzatura prodotta dal I2A francese (azienda che opera nella applicazione di metodi Artificial Intelligence a strumenti diagnostici denominata SIRSCAN .

La scelta del metodo per diffusione rispetto al metodo per diluizione (MIC) è basato sulla necessità di processare numerosi campioni giornalieri (3500 isolati nel 2022), di produrre raccolte trimestrali per specie e per agente eziologico, utili ai veterinari aziendali per avere una indicazione delle reali tendenze relative alle sensibilità ai presidi terapeutici disponibili. Il software di estrazione degli esiti di laboratorio consente di ottenere i dati nel tempo suddivisi per allevamento/sito, fase di produzione (scrofaia, svezzamento, ingrasso) ma anche per veterinario e/o tecnico.

I dati relativi a percentuale di Sensibile (S), Intermedio (I) e Resistente (R) nei confronti dei vari principi attivi/antibiotici nel tempo sono gestiti ed aggiornati su base annuale con un semplice file Excel.

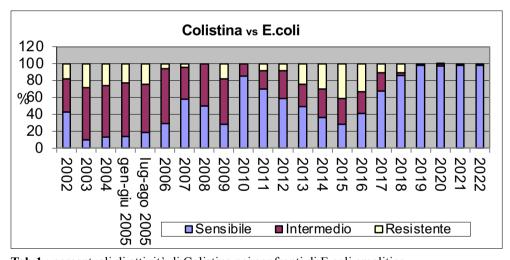
RISULTATI

Negli ultimi anni gli isolamenti per i tre principali patogeni sono stati nell'ordine delle centinaia. Nel solo 2022 sono stati isolati e testati per l'antibiotico-sensibilità ben 438 ceppi di Streptococcus suis, 195 ceppi di E.coli emolitico (principalmente dal post svezzamento), 153 ceppi di P. multocida e 36 ceppi di A. pleuropneumoniae. Altri batteri quali H.parasuis e Staph. Hyicus sono stati isolati occasionalmente e in numero molto più limitato. Per quanto riguarda Streptococcus suis si nota come, negli ultimi anni, sia aumentata la percentuale di ceppi che mostrano resistenza (R) verso ampicillina/amoxicillina (rispettivamente 10% e 7%), ma soprattutto si osserva crescita ancor più decisa (dal 19,9% nel 2020 al 38,1% del 2022) dei ceppi con sensibilità intermedia (I). Sempre molto buona la sensibilità degli Streptococchi nei confronti dell'associazione amoxicillina+acido clavulanico (97-98%). Sebbene la raccolta dati sia limitata ad un periodo di tempo più breve è interessante notare come sia buona – sebbene con una certa variabilità – l'attività di florfenicolo vs Strep. suis (85%-95% di sensibilità negli ultimi tre anni). Altrettanto stabile/poco variata sembrerebbe la sensibilità di *P. multocida* nei confronti degli antibiotici più utilizzati, con doxiciclina attiva nell'87,5% dei casi (OTC solo 67,3%). Bene amoxicillina e florfenicolo con oltre il 90% medio di attività (S) sempre nei confronti di P.multocida. Sempre buona ma leggermente in calo come attività la tilmicosina (Sensibilità media 79.8% negli ultimi tre anni). Per questo antibiotico (a causa della sua modalità di azione) è tipica l'assenza di ceppi di Pasteurella a sensibilità Intermedia. Sebbene il principio attivo sia stato inserito solo a partire dal 2019 nel panel di antibiotici disponibili risulta discreta (80% S) l'attività di Gamitromicina vs Pasteurella sebbene nell'ultimo anno ben 21% degli isolati sono risultati Resistenti. Tanti

invece i ceppi di *P.multocida* Resistenti verso l'associazione Sulfamidico + Trimethoprim (57% R e solo 42% S negli ultimi 5 anni).

Completamente diverso il quadro della sensibilità di *E.coli* emolitico nei confronti dei principali antibiotici normalmente attivi nei confronti dei Gram-negativi. Si nota chiaramente come per la totalità dei p.a. testati ci sia una grande variabilità di Sensibilità nel tempo con percentuali che raramente raggiungono il 50%. Per il gruppo Gentamicina-Apramicina-Neomicina-Spectinomicina la percentuale di isolati Sensibili negli ultimi 5 anni è variata tra il 32% (Gentamicina) e il 51% (Apramicina). Altrettanta variabilità si nota nei rapporti percentuali tra S/R/I con la sola gentamicina che quasi mai presenta sensibilità Intermedia passando quindi da S a R a seconda degli isolati.

Molta variabilità si nota per quanto riguarda la "famiglia" dei chinoloni con Enrofloxacina al 23% di R mentre generalmente Marbofloxacina si ferma al 9% di R. Molto numerosa la percentuale dei ceppi con sensibilità Intermedia per Enrofloxacina; circa il 50% negli ultimi 5 anni. Stesso quadro di grande variabilità in termini di S/R/I per l'associazione Amoxicillina+Ac.clavulanico con la percentuale di ceppi Resistenti in lieve ma costante aumento negli ultimi 5 anni. Grande la percentuale dei ceppi a sensibilità Intermedia (29% negli ultimi 5 anni) per cui i ceppi pienamente Sensibili sono solo il 51%. Tipico il pattern di attività dell'associazione Sulfamidico+Trimethoprim con la totalità dei ceppi che si mostra o Sensibile (43%) o Resistente (56%). Non è una prova di una relazione "causa-effetto" ma l'attività di colistina nei confronti degli E. coli testati sembrerebbe essere aumentata da quando ne è stato praticamente sospeso l'utilizzo.



Tab.1: percentuali di attività di Colistina nei confronti di E.coli emolitico

Sono relativamente pochi i ceppi di *Act. Pleuropneumoniae* isolati ma questi ancora mantengono una buona sensibilità nei confronti degli antibiotici beta-lattamici con Sensibilità media al 67,2% per ampicillina/amoxicillina e al 96,8% per l'associazione amoxicillina+acido clavulanico (nessun APP ha mai mostrato alcuna Resistenza per questa associazione).

Molto buona anche l'attività di florfenicolo con percentuale di Sensibilità media del 90,3% negli ultimi cinque anni con rarissimi ceppi Resistenti. Scarsa e con tanta variabilità l'attività di ossitetraciclina (solo 53,4% gli isolati pienamente Sensibili negli ultimi cinque anni) mentre doxiciclina – sempre con grande variabilità da anno ad anno – sembra mostrare un certo aumento di attività (S) con solo 7% dei ceppi completamente Resistenti. 76% la

percentuale di APP pienamente Sensibili a tilmicosina mentre risulta essere molto variabile l'attività dei chinoloni col 65,6% di ceppi Sensibili e molti Intermedi; tra le molecole di questa famiglia molto buona l'attività di marbofloxacina verso la quale nell'ultimo anno (2022) tutti gli isolati sono risultati pienamente Sensibili. Per quanto riguarda i p.a. disponibili in forma iniettabile (spesso necessaria per trattare casi acuti) ceftiofur mostrerebbe una certa perdita di attività (S) negli anni (66,7% S – 22,2 I – 11,1% R nel 2022) mentre gamitromicina – testata solo a partire dal 2019 – mostra una attività molto variabile (69,5% S – 19,4 I – 11,1% R nel 2022).

DISCUSSIONE

E' difficile e non sarebbe corretto trarre conclusioni definitive dai dati raccolti ma risulta abbastanza evidente come E.coli presenti un profilo di antibiotico sensibilità estremamente variabile per cui – specialmente nei casi clinici più gravi - risulta importante conferire materiale al Laboratorio per avere indicazioni di terapia più "accurate/aggiornate".

La maggior resistenza di *E. coli* emolitico registrata dal 2013 al 2016 per colistina è anche favorito, oltre dall'utilizzo di questo p.a., dalla diffusione del gene mobilizzato della resistenza a questo antibiotico che conferisce una resistenza mediata dal plasmide alla colistina. In un certo senso preoccupa anche il pattern di antibiotico sensibilità che *Streptococcus suis* sta mostrando negli ultimi anni: sebbene i ceppi completamente Resistenti nei confronti di ampicillina/amoxicillina siano ancora pochi sono in deciso aumento gli isolati con sensibilità Intermedia nei confronti di questa che è la famiglia di antibiotici più utilizzata in campo. Per quanto riguarda *S. suis*, la resitenza alle b-lattamine sembra essere, nella maggior parte dei casi, conseguenza di mutazioni a carico dei geni che codificano per le penicilin-binding proteins (PBPs) che ridurrebbero l'affinità delle PBPs per questi composti.

CONCLUSIONI

Nell'ottica dell'utilizzo consapevole degli antibiotici per ridurre il fenomeno della antibiotico-resistenza, l'attività diagnostica del Laboratorio è fondamentale per fornire al veterinario indicazioni relative alla scelta del principio attivo da utilizzare. Purtroppo, per vari motivi (necessità di intervento immediato, indisponibilità di materiale idoneo da inviare o semplicemente per motivi logistici), non sempre è possibile avere questo tipo di informazione in tempo utile. Ecco che allora risulta particolarmente importante il concetto di "diagnosi di filiera" e la disponibilità di una "serie storica" di dati dai quali potere attingere per impostare, in tempo utile e con cognizione di causa, una terapia razionale. E' in questo modo che i veterinari della filiera produttiva da oltre venti anni possono attingere ai dati di antibiotico sensibilità dei patogeni isolati nelle varie filiere produttive.

BIBLIOGRAFIA

- 1. https://www.izsvenezie.it/temi/altri-temi/antibiotico-resistenza-sensibilita/report-pubblico/
- 2. https://www.alimenti-salute.it/content/linee-guida-uso-antibiotici-nellallevamento-suino
- 3. Tarakdjian, J., Capello, K., Pasqualin, D., Santini, A., Cunial, G., Scollo, A., Martino, G. D. (2020). Animals, 10(3), 417. Antimicrobial use on Italian Pig Farms and its Relationship with Husbandry Practices.
- 4. Zhou Y, Fu H, Yang H, Wu J, Chen Z, Jiang H, Liu M, Liu Q, Huang L, Gao J, Chen C.Microbiome. 2022 Mar 4;10(1):39. doi: 10.1186/s40168-022-01241-y.
- 5. Extensive metagenomic analysis of the porcine gut resistome to identify indicators reflecting antimicrobial resistance.

- 6. Bunner CA, Norby B, Bartlett PC, Erskine RJ, Downes FP, Kaneene JB.
- 7. Prevalence and pattern of antimicrobial susceptibility in Escherichia coli isolated from pigs reared under antimicrobial-free and conventional production methods. J Am Vet Med Assoc. 2007 Jul 15;231(2):275-83. doi: 10.2460/javma.231.2.275. PMID: 17630898.
- 8. Holmer et al.
- 9. Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage
- 10. BMC Veterinary Research (2019) 15:449https://doi.org/10.1186/s12917-019-2162-8
- 11. Uruén, C., García, C., Fraile, L. et al. How Streptococcus suis escapes antibiotic treatments. Vet Res 53, 91 (2022). https://doi.org/10.1186/s13567-022-01111-3

DIFFUSIONE DI CLONI DI STREPTOCOCCUS SUIS SIEROTIPO 9 CARATTERIZZATI DA UNA RIDOTTA SENSIBILITÀ AI BETA LATTAMICI IN ITALIA

SPREAD OF STREPTOCOCCUS SUIS SEROTYPE 9 STRAINS CHARACTERIZED BY A REDUCED SUSCEPTIBILITY TO BETA-LACTAMS IN ITALIAN PIG FARMS

CUCCO L.¹, MASSACCI F.R.¹, PANICCIÀ M.¹, LUPPI A.², ALBINI E.¹, FERRONI L.¹; USTULIN M.³, PERUZZO A.³, ORSINI M.³, MAGISTRALI C.F.¹

¹ Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati' ² Istituto zooprofilat tico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna ³ Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie

Parole chiave: *Streptococcus suis*, sierotipo 9, beta-lattamici **Keywords**: *Streptococcus suis*, serotype 9, beta-lactams

Parole chiave: Streptococcus suis, Penicillin Binding Protein, Sequence Type **Keywords:** Streptococcus suis, Penicillin Binding Protein, Sequence Type

RIASSUNTO

Streptococcus suis è uno dei più importanti patogeni del suino ed un agente di zoonosi. In uno studio precedente abbiamo descritto un incremento delle infezioni da S. suis sierotipo 9 (SS9) negli allevamenti in Italia. Un elevato numero di isolati apparteneva al sequence type (ST) 123, e presentava una ridotta sensibilità alla penicillina. Scopo di questo lavoro è stato indagare l'andamento della sensibilità ai beta-lattamici di SS9 in Italia dal 2002 al 2021. Abbiamo analizzato 66 isolati di SS9 da casi clinici di streptococcosi, definendone ST, sensibilità agli antibiotici, presenza di geni di antibiotico-resistenza e virulenza e sostituzioni a carico delle Penicillin Binding Protein (PBP). I genomi degli isolati italiani sono stati confrontati con quelli di SS9 disponibili nelle banche dati. Gli ST più frequenti sono stati ST123 e ST16, che differivano in termini di fattori di virulenza e di sensibilità ai beta-lattamici. Gli isolati appartenenti al ST123, ST1954 e ST94 erano nello stesso gruppo filogenetico di isolati spagnoli, e distinti da isolati di altra origine. Una ridotta sensibilità si è osservata non solo alla penicillina, ma anche a ceftiofur e ampicillina, in questo caso senza arrivare ad una resistenza clinica. La sensibilità a penicillina si è ridotta nel corso del periodo di osservazione, ed era associata ai ST123, ST1540 e ST1953. I ceppi caratterizzati da una bassa sensibilità ai betalattamici presentavano una caratteristica struttura a mosaico delle PBP. Il lavoro indica che la sensibilità alla penicillina di SS9 si sta progressivamente riducendo negli allevamenti italiani grazie all'espansione di alcuni cloni batterici, probabilmente a causa della pressione selettiva generata dall'impiego di antibiotici.

ABSTRACT

Streptococcus suis is one of the most important swine pathogens and an emerging zoonotic agent. In a previous study we described an increase of *S. suis* serotype 9 (SS9) infections in pig herds in Italy: most isolates belonged to sequence type (ST) 123, and were characterized by a reduced sensitivity to penicillin. The aim of this work was to investigate the trend of sensitivity to beta-lactams of SS9 in Italy from 2002 to 2021. We analysed 66 isolates of SS9 isolated from clinical cases of streptococcosis, in terms of ST, sensitivity to antibiotics,

presence of genes coding for antibiotic resistance and virulence and substitutions in the Penicillin Binding Protein (PBP). The genomes of the Italian isolates were compared with the SS9 genomes available in public repositories. The most frequent STs were ST123 and ST16, which differed in terms of virulence factors and sensitivity to beta-lactams. The isolates belonging to ST123, ST1954 and ST94 clustered together in the same phylogenetic group with isolates from Spain, and distinct from isolates of other origin. A reduced susceptibility was observed not only to penicillin, but also to ceftiofur and ampicillin, without reaching clinical resistance. The susceptibility to penicillin decreased over the observation period, and was associated with ST123, ST1540 and ST1953. Strains characterized by low susceptibility to beta-lactams showed a characteristic mosaic structure of the PBPs. In conclusion, the susceptibility to penicillin of SS9 is progressively decreasing in Italian herds, coupled with the spread of some bacterial clones. This phenomenon is probably favoured by the use of antibiotics.

INTRODUZIONE

Streptococcus suis è riconosciuto in tutto il mondo come un patogeno suino associato a diverse condizioni cliniche quali meningite, artrite, endocardite o setticemia. Si tratta anche di un microrganismo zoonotico responsabile di setticemia, endocardite e meningite nell'uomo (Zheng et al., 2018). Si riconoscono 29 sierotipi di S. suis, caratterizzati da diversa patogenicità; S. suis sierotipo 2 (SS2) è considerato il sierotipo prevalente nei casi di streptococcosi suina e umana in tutto il mondo (Estrada et al., 2019). Nel corso degli ultimi 20 anni tuttavia, si è assistito ad un progressivo aumento dei casi sostenuti da S. suis sierotipo 9 (SS9), sia in Europa che in Cina (Zheng et al., 2018). Inoltre nel 2015 in Thailandia è stato segnalato il primo caso di infezione umana legata a SS9 (Willemse et al., 2019). In uno studio recente abbiamo descritto un incremento delle infezioni da SS9 negli allevamenti suini in Italia (Cucco et al., 2022). Un elevato numero di isolati SS9 italiani apparteneva ad un sequence type (ST) 123, precedentemente segnalato in Spagna nel 2009 (Blume et al., 2009). Inoltre, gli isolati italiani erano caratterizzati da una ridotta sensibilità alla penicillina e questa ridotta sensibilità caratterizzava in particolare ST123. La limitata efficacia dei vaccini disponibili per S. suis rende gli antibiotici uno strumento chiave per il trattamento, la prevenzione e il controllo delle infezioni sostenute da S. suis (Hadjirin et al., 2021). I beta-lattamici rappresentano la classe di prima linea per la terapia della streptococcosi. Il bersaglio dei beta-lattamici è costituito dalle proteine leganti la penicillina (Penicillin Binding Protein, PBP), coinvolte nella biosintesi della parete cellulare batterica. Questi antibiotici si legano covalentemente ai tre siti attivi dei domini attivi delle PBP, SXXK, (S/Y)XN e (K/H)(D/T)G, e impediscono il legame con i peptidi, una fase cruciale nella sintesi del peptidoglicano. Il fenomeno della resistenza ai beta-lattamici è stato ampiamente studiato in S. pneumoniae: in questa specie, il meccanismo di resistenza è legato ad una ridotta affinità delle PBP per questi antibiotici. A livello delle PBP, la ridotta affinità per i beta-lattamici è legata a molteplici sostituzioni degli aminoacidi nei siti attivi delle sequenze (Zapun et al., 2008). Meno informazioni sono disponibili per altre specie del genere. Tuttavia, dopo la segnalazione di ceppi penicillino-resistenti in S. suis, l'interesse per la resistenza ai beta-lattamici in questa specie è aumentato. Negli ultimi due anni, Bamphensin ha descritto le mutazioni delle PBPs in S. suis penicillino-resistente isolato dall'uomo in Thailandia (Bamphensin et al., 2021), mentre Hadijirin (Hadjirin et al., 2021) ha esplorato gli effetti delle mutazioni della sequenza delle PBP sulla sensibilità ai beta-lattamici in S. suis.

L'ipotesi alla base di questo studio è che una ridotta sensibilità ai beta-lattamici sia emersa in alcuni cloni SS9 di *S. suis* e abbia contribuito al successo della loro diffusione, come possibile conseguenza dell'uso di beta-lattamici negli allevamenti suini italiani. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare l'andamento della sensibilità ai beta-lattamici della popolazione di SS9 *S. suis* proveniente da suini malati in Italia negli ultimi venti anni, correlandolo all'appartenenza ai diversi ST e alle sostituzioni a carico delle PBP.

MATERIALI E METODI

Test microbiologici

66 isolati raccolti da suini con infezione clinica da *S. suis* in allevamenti dell'Italia centro-settentrionale durante il periodo 2002-2021, appartenenti al SS9 sono stati inclusi in questo lavoro. Una parte di questi isolati era stata analizzata in un nostro precedente studio (Cucco et al., 2022). Il criterio applicato per evitare ridondanze è stato includere solo 1 isolato per anno e per azienda di *S. suis*. I campioni sono stati seminati su Agar Sangue (5% globuli rossi di montone), incubati a 37°C in atmosfera arricchita con 5% CO2, e identificati mediante MALDI-TOF (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). Tutti gli isolati sono stati testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici mediante il metodo della diluizione in brodo, usando un pannello commerciale 96-wellmicrotitre MIC (BOP06F, Sensititre; Trek Diagnostic Systems Inc., England) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 è stato usato come ceppo di controllo. I valori di MIC sono stati interpretati utilizzando i breakpoint raccomandati dal Clinical Laboratory Standard Institute per *S. suis* (CLSI VET 01-ed.5, 2020). In assenza di breakpoint specifici per *S. suis*, per trimetoprim/sulfametossazolo e clindamicina si sono applicati i criteri interpretativi per *S. pneumoniae*.

Analisi genomica

Il DNA genomico dei 66 isolati di *S. suis* è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) per poi essere sottoposto a sequenziamento utilizzando la piattaforma Illumina NextSeq 500. Dopo le fasi di *trimming* e valutazione di qualità, le sequenze sono state assemblate usando SPAdes genome assembler v3.11.1 (Prjibelski et al., 2014) e annotate usando Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014). I prodotti generati da Prokka sono stati analizzati con Roary v3.11.3 (Page et al., 2015) per ottenere un allineamento del core genome utilizzato per creare un albero filogenetico di massima verosimiglianza con FastTree 2.1.11 (Price et al., 2010). Dal database Sequence Read Archive (SRA) sono state scaricate le sequenze dei genomi di *S. suis* SS9 tra quelle disponibili in letteratura, per essere confrontate tramite l'albero filogenetico con le sequenze dei nostri genomi SS9.

Le sequenze dei 66 ceppi di *S. suis* sono state utilizzate per identificare il ST utilizzando *S. suis* MLST database (https://pubmlst.org/ssuis/), il profilo di virulenza mediante la ricerca dei geni di virulenza utilizzando BLASTN v2.13.0 (Camacho et al., 2009) e i geni resistenti agli antimicrobici che sono stati analizzati con ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate).

La resistenza ai beta-lattamici è stata studiata analizzando le mutazioni all'interno delle PBP (PBP1A, PBP1B, PBP2A, PBP2B e PBP2X). Le sequenze delle PBP dei 66 isolati sono state allineate manualmente con MUSCLE online (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/) utilizzando Streptococcus suis BM407 (GenBank GCA_000026745.1) come riferimento.

Analisi statistica

L'associazione tra i valori di MIC, l'anno di isolamento e il ST di appartenenza è stata studiata utilizzando la funzione lm di R software (v 4.1.3). In particolare, tutti gli ST che presentavano meno di due isolati sono stati accorpati in un'unica categoria e l'associazione tra ciascun ST e l'esito di MIC è stata valutata considerando l'appartenenza a ST16 come baseline. I valori di MIC sono stati trasformati in log e sono stati costruiti tre modelli utilizzando penicillina, ceftiofur e ampicillina come variabili dipendenti.

Per quanto riguarda la correlazione tra le sostituzioni delle PPB e la resistenza ai beta-lattamici, questa è stata indagata attraverso un processo in più fasi. Innanzitutto, la distribuzione delle diverse sostituzioni negli isolati è stata esplorata mediante heatmap utilizzando R software (Figura 2). Quindi, la associazione di più sostituzioni in un unico blocco è stata confermata mediante analisi tetracorica in R, accorpando tutte le sostituzioni con un indice uguale o superiore a 0.8. Infine, utilizzando la funzione di regressione lineare (lm) di R è stata testata la associazione tra i blocchi

di sostituzioni di PBP e i valori di MIC per penicillina, ampicillina e ceftiofur, trasformati in log. Per quanto riguarda i geni di virulenza, abbiamo preso in considerazione il numero totale di geni rilevati in ciascun isolato e abbiamo valutato le differenze fra isolati appartenenti a ST differenti. In particolare, dopo aver controllato la normalità dei dati utilizzando il test di normalità di Shapiro-Wilk, abbiamo eseguito il Kruskal-Wallis rank sum test, e conseguentemente il post hoc test di Dunn per confronti multipli. Abbiamo poi creato una heatmap che rappresentasse per ciascun isolato la presenza/assenza dei geni di virulenza utilizzando R software.

Per tutte le analisi, è stato applicato un limite di significatività pari a p<0,05.

RISULTATI

Sono stati identificati tredici diversi ST: ST123, ST136, ST1540, ST1541, ST1546, ST16, ST17, ST1953, ST1954, ST1955, ST1956, ST1957 e ST94. ST123 e ST16 sono stati gli ST più diffusi, rappresentando rispettivamente il 53% (n = 35) e il 13,6% (n = 9) dei nostri isolati. Cinque nuovi ST sono stati identificati come ST1953-ST1957 (ID3308-ID3314; https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis). Sono 86 i geni di virulenza rilevati in almeno un isolato. La presenza/assenza di questi geni in ciascuno dei 66 isolati classificati rispetto al ST di appartenenza è stata rappresentata tramite una heatmat nella Figura 1, che evidenzia come gli SP si differenzino tra di loro rispetto alla distribuzione dei geni di virulenza sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo.



Figura 1. *Heatmap* che mostra la distribuzione dei geni di virulenza nei 66 isolati di *S. suis*. Il blu rappresenta la presenza e il bianco l'assenza di un gene di virulenza.

Figure 1. Heatmap demostrating the distribution of virulence genes in the 66 *S. suis* isolates. Blue represents the presence and white represents the absence of a virulence gene.

Il test di Kruskal-Wallis, effettuato sul numero totale di geni di virulenza rilevati in ciascun isolato, ha dimostrato in generale una differenza significativa tra gli isolati appartenenti a ST differenti (p<0.001). In particolare, il numero di geni di virulenza degli isolati ST123 differiva da quello degli isolati ST16; tale differenza è stata riscontrata anche tra ST1540 e ST16 e tra ST1540 e ST94 (p<0,05; Dunn test). Un blocco di 18 geni di virulenza risultava caratteristico degli isolati ST123 e ST94. Altri cluster di geni di virulenza risultavano evidenti nella heatmap e riguardavano gli ST16 e gli ST1540.

La Tabella 1 mostra la distribuzione dei 66 isolati di *S. suis* sulla base dei valori di MIC nei confronti di 8 molecole antibiotiche. Tutti gli isolati erano sensibili ad ampicillina e a ceftiofur, mentre il 36,4% (n=24) erano resistenti alla penicillina. Un numero elevato di isolati era resistente alla clindamicina (n=52, 85,2%) e tutti gli isolati erano resistenti a tetraciclina (n=66). Bassi livelli di resistenza sono stati osservati per sulfametoxazolo/trimetoprim (n=5, 7,6%), florfenicolo (n=1, 1,5%) ed enrofloxacina (n=1, 1,5%).

E' importante sottolineare come la ridotta sensibilità alla penicillina si sia osservata in modo diverso nei ST, e in particolare come in ST16 la sensibilità si mantenga al di sotto di 0,12 μ g/ml, mentre 32/35 isolati appartenenti a ST123 si caratterizzavano per valori di MIC > 0,12 μ g/ml (Figura 2). *TetO* e *ermB* sono stati i principali geni di antibiotico-resistenza descritti negli isolati. Altri geni sono stati *aph*(3') (n=6), fexA (n=1), *optrA* (n=3), *lnuB* (n=5) e *spc* (n=5).

Tabella 1. Distribuzione dei valori di MIC tra i 66 isolati di *S. suis*. Tra parentesi sono indicate le percentuali. L'area in grigio rappresenta il *range* di concentrazioni testate per ciascun antibiotico. Le linee verticali indicano la soglia per la resistenza secondo quanto indicato dal CLSI.

Table 1. Distribution of MIC values among the 66 *S. suis* isolates. Percentages are shown in brackets. Shades areas show the range of values actually tested for each antibiotic. Vertical bars indicate the threshold values for clinical resistance, according to CLSI.

Antibiotici	Valori di MIC μg/ml												
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Ceftiofur		28 (42.4%)	16 (24.3%)	16 (24.3%)	6 (9%)								
Penicillina G	25 (37.9%)	6 (9%)	11 (16.7%)	22 (33.4%)	2 (3%)								
Ampicillina		57 (87.4%)	3 (4.6%)	6 (9%)									
Enrofloxacin		1 (1.5%)	18 (27.3%)	46 (69.7%)	1 (1.5%)								
Tetraciclina				1 (1.5%)	1 (1.5%)			64 (97%)					
Florfenicolo			2 (3%)	46 (69.7%)	17 (25.8%)		1 (1.5%)						
SXT*			61 (92.4%)			5 (7.6%)							
Clindamicina		9 (14.8%)		1 (1.6%)					51 (83.6%)				
Tilosina			9 (14.8%)							52 (85.2%)			
Neomicina						31 (50.8%)	13 (21.3%)	7 (11.5%)	5 (8.2%)	5 (8.2%)			
Gentamicina				6 (9.8%)	40 (65.6%)	6 (9.8%)	1 (1.7%)	2 (3.3%)	6 (9.8%)				
SDM**											16 (26.2%)		45 (73.8%)

^{*} SXT: Sulfametossazolo+Trimethoprim** SDM: Sulfadimetossina

Il numero totale di mutazioni a livello delle PBP varia da 0, osservato in un isolato di cinghiale, a 152, riscontrate in un isolato ST1541 isolato nel 2017. Il maggior numero di sostituzioni è stato riscontrato nella sequenza PBP2X, con un massimo di 77 sostituzioni per isolato, mentre 31 è stato il numero massimo di sostituzioni in PBP2B riscontrato in un singolo isolato. Le altre tre PBP hanno mostrato un numero massimo di sostituzioni pari a 7 (PBP1B), 13 (PBP1A) e 37 (PBP2A). Come mostrato nella Figura 2, è interessante notare come la distribuzione delle sostituzioni tra gli isolati di S. suis non sia casuale. Gli isolati infatti, clusterizzano in base alle sostituzioni, rivelando un'architettura a mosaico delle PBP. Come mostra la Figura 3, i valori di MIC (log) per la penicillina hanno avuto un andamento tendenzialmente crescente dal 2002 al 2021. Tale tendenza è stata confermata dall'analisi di regressione multipla (R² aggiustato=0.661) che ha evidenziato da un lato un'associazione positiva tra i valori di MIC (log) per la penicillina e l'anno di isolamento (p=0,0018; coeff. 0.018 IC95%=0.007-0.029), e dall'altro come l'appartenenza a ST123, ST1540 e ST1953 sia risultata associata a più alti livelli di MIC (log) rispetto a quelli relativi ad ST16 (ST123: p<0,001, coeff. 0,718 IC95%=0,534-0,903; ST1540: p=0,037, coeff. 0,281 IC95%=0,017-0,544; ST1953: p<0.001, coeff. 0.824 IC95%=0.436-1.211).

In particolare, il modello evidenzia un incremento annuo del valore di MIC per penicillina di circa il 4%. Mentre l'appartenenza a ST123 è associata a valori di MIC per penicillina 5,2 volte superiori a quelli osservati per ST16; 1,9 volte nel caso di ST1540 e 6,7 volte nel caso di ST1953.

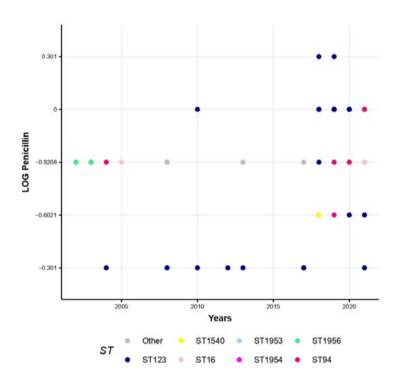
Figura 2. *Heatmap* che mostra la distribuzione delle sostituzioni a livello delle PBP nei 66 isolati di *S. suis*. Il colore blu rappresenta la presenza e il bianco l'assenza di ciascuna sostituzione.

Figure 2. Heatmap demonstrating the distribution of PBP substitutions in the 66 *S. suis* isolates. Blue and white represents the presence and the absence of a specific substitution, respectively.



Figura 3. Distribuzione dei valori di MIC trasformati in log nei diversi anni di isolamento. Ogni punto rappresenta un isolato ed il colore appartenenza al ST.

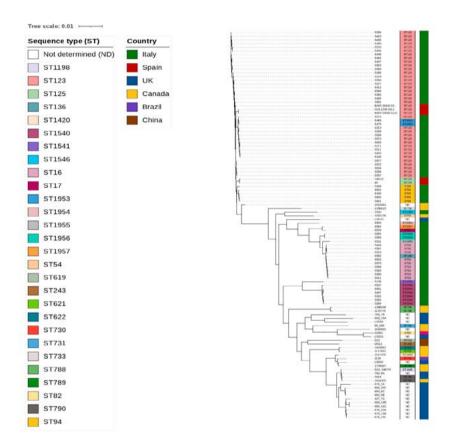
Figure 3. Distribution of the MIC values log-transformed among the years of isolation. Dots are coloured according to ST.



Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, come mostrato in Figura 4, i 106 isolati SS9 si distribuiscono in 5 distinti cluster. Il cluster più grande (*phylogenetic cluster* 1) è costituito da 42 isolati italiani appartenenti a ST123, ST1953 e ST94 e da 5 ceppi spagnoli appartenenti a ST123 e ST125. Un ceppo canadese (ST54) e uno italiano ST1546 sono raggruppati in un secondo *cluster*. Gli isolati di *S. suis* italiani appartenenti a ST16 e un ST136 si trovavano nel terzo *phylogenetic cluster*, mentre gli isolati ST1540 appartengono al quarto *cluster*. Il quinto *cluster* è composto dai restanti 31 isolati provenienti da 4 Paesi diversi (Regno Unito, Brasile, Canada e Cina).

Figura 4. Albero filogenetico annotato utilizzando iTOL (https://itol.embl.de/). L'albero contiene i 106 isolati di *S. suis* SS9 analizzati nel presente studio. I *sequence type* (ST) e la provenienza geografica di ciascun isolato sono rappresentati nell'albero.

Figure 4. Phylogenetic tree annotated using iTOL (https://itol.embl.de/). The tree contains the 106 isolates of *S. suis* SS9 analyzed in the present study. The sequence types (ST) and geographic origin of each isolate are represented in the tree.



DISCUSSIONE

Questo lavoro ci ha permesso di caratterizzare *S. suis* sierotipo 9 circolanti in Italia dal 2002 in termini di ST e sensibilità agli antimicrobici e di approfondire in particolare la resistenza ai beta-lattamici mediante lo studio delle mutazioni a livello delle PBP.

Tra gli SS9 isolati da suini in corso di streptococcosi in Italia, il ST123 è stato il più frequentemente riscontrato, seguito dal ST16. Entrambi gli ST sono già stati segnalati in suini in Europa: il ST123 in Spagna (Blume et al., 2009) e il ST16 in Olanda (Willemse et al., 2016). Il ST16 è considerato un ST emergente grazie alle sue caratteristiche di patogenicità e al suo potenziale zoonotico (Willemse et al., 2019). Nel nostro lavoro, ST16 e ST123 erano nettamente distinti sia in termini di fattori di patogenicità, sia come sensibilità ai beta lattamici. Tra gli ST123 analizzati nel presente lavoro, la maggior parte è risultata resistente alla penicillina, mentre gli isolati afferenti a ST16 erano completamente sensibili ai beta-lattamici. Gli ST123 erano inoltre caratterizzati da valori di MIC più elevati per gli altri beta-lattamici, ceftiofur e ampicillina, nonostante questa ridotta sensibilità non abbia raggiunto

i livelli di resistenza clinica. Tuttavia, la ridotta sensibilità ai beta-lattamici non era ristretta a ST123, ma coinvolgeva altri ST, tra cui ST1953, che differiva da ST123 per un singolo allele, e ST1540. Gli isolati ST123, ST1953 e ST94 di origine italiana erano collocati all'interno dello stesso *phylogenetic cluster* dei ceppi ST123 e ST125 di origine spagnola e, a differenza degli isolati appartenenti a ST16, si distinguevano nettamente da altri ceppi di SS9 isolati in Cina, Regno Unito o Canada.

Da un punto di vista temporale, è stata riscontrata un'associazione tra una ridotta sensibilità a penicillina e l'anno di isolamento. La sensibilità a penicillina è infatti diminuita significativamente dal 2004 al 2021 ed è risultata fortemente associata a ST123, ST1953 e ST1540.

Anche all'interno di ST123 tuttavia, la sensibilità ai beta lattamici non era omogenea. Infatti sono stati osservati isolati ST123 caratterizzati da una piena sensibilità ai beta-lattamici accanto ad isolati clinicamente resistenti. Gli isolati ST123 clinicamente resistenti a penicillina provenivano esclusivamente da casi osservati a partire dal 2017. Anche per ceftiofur valori di MIC superiori a 1µg/ml sono stati osservati solo dopo il 2017. Questi risultati confermano che la sensibilità ai beta-lattamici si è progressivamente ridotta negli ultimi vent'anni.

Le sostituzioni osservate nelle sequenze di PBP non erano indipendenti l'una dall'altra, ma associate in grandi blocchi, con una caratteristica struttura a mosaico (Zapun et al., 2008). La sequenza amminoacidica nelle PBP mosaico poteva infatti differire dalla sequenza non a mosaico fino al 10% (osservata in PBP2X). È interessante notare che alcune sostituzioni che abbiamo trovato associate negli stessi blocchi sono state rilevate insieme anche da Bamphesin (2021), che le ha descritte in isolati di *S. suis* di origine umana, appartenenti ai sierotipi 2, 14 e 24 (Bamphensin et al., 2021). Alcune di queste sostituzioni, come la T551S a carico di PBP2X, sono già state inoltre descritte da Hadjirin (2021) in associazione ad una riduzione della sensibilità ai beta-lattamici e trovano riscontro in altre specie di *Streptococcus* spp.

In *S. pneumoniae*, l'origine delle sequenze codificanti PBP con bassa affinità per i beta-lattamici è stata fatta risalire a specie commensali appartenenti allo stesso genere, *Streptococcus mitis* o *Streptococcus oralis*: le sequenze mosaico sono state poi acquisite da *S. pneumoniae* probabilmente tramite trasformazione (Zapun et al., 2008); (Chagneau et al., 2022). La presenza di grandi blocchi di mutazioni nei nostri isolati suggerisce che un fenomeno simile potrebbe essersi verificato in *S. suis*, probabilmente favorito dalla pressione selettiva generata dall'uso di beta-lattamici nei suini.

CONCLUSIONI

L' espansione dei cloni di *S. suis* caratterizzati da una bassa sensibilità ai beta lattamici sta portando ad una progressiva diminuzione di efficacia a questi antibiotici, un evento già verificatosi per *S. pneumoniae*. Questo evento è particolarmente indesiderato in un batterio con limitati strumenti di controllo negli allevamenti e caratterizzato da potenzialità zoonosiche. L'impiego dei beta-lattamici degli allevamenti deve essere il più possibile limitato, ed è necessario attivare un sistema per il monitoraggio continuo di questo fenomeno.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Bamphensin, N., Chopjitt, P., Hatrongjit, R., Boueroy, P., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., & Kerdsin, A. (2021). Non-penicillin-susceptible streptococcus suis isolated from humans. Pathogens, 10(9). https://doi.org/10.3390/pathogens10091178
- Blume, V., Luque, I., Vela, A. I., Borge, C., Maldonado, A., Domínguez, L., Tarradas, C., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2009). Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of Streptococcus suis swine isolates. International Microbiology, 12(3), 161–166. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.94
- 3. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. BMC Bioinformatics,

- 10. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421
- 4. Chagneau, C. v., Alcouffe, O., Grare, M., Oswald, E., & Massip, C. (2022). Screening for ?-lactam resistance by penicillin G in the Streptococcus anginosus group challenged by rare strains with altered PBPs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 77(7), 1847–1850. https://doi.org/10.1093/jac/dkac139
- 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
- 6. Estrada, A. A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., & Marthaler, D. G. (2019). Serotype and genotype (multilocus sequence type) of Streptococcus suis isolates from the United States serve as predictors of pathotype. Journal of Clinical Microbiology, 57(9), 1–16. https://doi.org/10.1128/JCM.00377-19
- Hadjirin, N. F., Miller, E. L., Murray, G. G. R., Yen, P. L. K., Phuc, H. D., Wileman, T. M., Hernandez-Garcia, J., Williamson, S. M., Parkhill, J., Maskell, D. J., Zhou, R., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Tucker, A. W. (Dan), Hoa, N. T., Welch, J. J., & Weinert, L. A. (2021). Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen Streptococcus suis. BMC Biology, 19(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/ s12915-021-01094-1
- 8. Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics, 31(22), 3691–3693. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421
- 9. Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PLoS ONE, 5(3), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490
- Prjibelski, A. D., Vasilinetc, I., Bankevich, A., Gurevich, A., Krivosheeva, T., Nurk, S., Pham, S., Korobeynikov, A., Lapidus, A., & Pevzner, P. A. (2014). ExSPAnder: A universal repeat resolver for DNA fragment assembly. Bioinformatics, 30(12), 293–301. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu266
- 11. Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics, 30(14), 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153
- 12. Willemse, N., Howell, K. J., Weinert, L. A., Heuvelink, A., Pannekoek, Y., Wagenaar, J. A., Smith, H. E., van der Ende, A., & Schultsz, C. (2016). An emerging zoonotic clone in the Netherlands provides clues to virulence and zoonotic potential of Streptococcus suis. Scientific Reports, 6(January), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep28984
- 13. Willemse, N., van der Ark, K. C. H., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H., Picavet, D. I., van Solt-Smits, C., Wisselink, H. J., Schultsz, C., & de Greeff, A. (2019). Clonal expansion of a virulent Streptococcus suis serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. Scientific Reports, 9(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0
- 14. Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and β-lactam resistance. FEMS Microbiology Reviews, 32(2), 361–385. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x
- Zheng, H., Du, P., Qiu, X., Kerdsin, A., Roy, D., Bai, X., Xu, J., Vela, A. I., & Gottschalk, M. (2018). Genomic comparisons of Streptococcus suis serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. Veterinary Research, 49(1), 1–13. https://doi. org/10.1186/s13567-017-0498-2

UN BLEND DI TIMOLO ED ACIDI ORGANICI PUÒ SUPPORTARE L'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ANTIBIOTICI CONVENZIONALI CONTRO STREPTOCOCCUS SUIS

A BLEND OF THYMOL AND ORGANIC ACIDS CAN SUPPORT THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CONVENTIONAL ANTIBIOTICS AGAINST STREPTOCOCCUS SUIS

GIOVAGNONI G.1, TUGNOLI B.2, PIVA A.1,2, GRILLI E.1,3

¹ DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia; ² Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia; ³ Vetagro Inc.,17 East Monroe Street, Suite #179, Chicago, IL 60603, USA

Parole chiave: *Streptococcus suis*, composti bioattivi, additivi per mangimi **Keywords:** *Streptococcus suis*, bioactive compounds, feed additives

RIASSUNTO

L'obiettivo di questo studio è stato valutare l'attività antimicrobica di antibiotici convenzionali, acidi organici e composti naturali identici contro cinque ceppi di campo di *Streptococcus suis* e, in secondo luogo, verificare se la combinazione di queste sostanze potesse supportare l'azione di antibiotici non efficaci contro uno dei sierotipi più diffusi a livello globale. È stato innanzitutto eseguito un test di minima concentrazione inibente (MIC) in microdiluizione seguendo le direttive del CLSI. Tetraciclina, neomicina, tilosina e tiamulina sono risultati gli antibiotici con pattern di sensibilità variabili e valori MIC più elevati. Tra gli acidi organici e composti naturali identici testati, acido citrico, acido dodecanoico e timolo hanno avuto l'effetto inibitorio più marcato. Pertanto questi composti sono stati combinati al fine di realizzare un prototipo, utilizzato per aumentare l'efficacia degli antibiotici sopracitati. La combinazione è stata testata contro il ceppo 703 (sierotipo 2) ed ha permesso di supportare l'azione dei quattro gli antibiotici convenzionali, inibendo complessivamente la crescita batterica tra il 74 ed il 92%. La miscela di acido citrico, acido dodecanoico e timolo può essere quindi utilizzata per contrastare il fenomeno dell'antibiotico resistenza.

Abstract: The objective of this study was to assess the antimicrobial activity of conventional antibiotics, organic acids and nature identical compounds against five field strains of Streptococcus suis, and then to examine whether the combination of these substances could support the action of not effective antibiotics against one of the most common serotypes worldwide. A minimal inhibitory concentration (MIC) test was first performed using the microdilution method following the CLSI guidelines. Tetracycline, neomycin, tylosin, and tiamulin showed variable sensitivity patterns and the higher MIC values. Among the tested organic acids and nature identical compounds, citric acid, dodecanoic acid, and thymol had the most marked inhibitory effect. Therefore, these compounds were combined in order to create a prototype, used to increase the efficacy of the abovementioned antibiotics. The combination was tested against strain 703 (serotype 2) and supported the action of the four conventional antibiotics, inhibiting bacterial growth between 74 and 92% overall. The mixture of citric acid, dodecanoic acid, and thymol can thus be used to counteract the antibiotic resistance issue.

INTRODUZIONE

Streptococcus suis è un batterio Gram positivo anaerobio facoltativo che rappresenta una minaccia nell'ambito della suinicoltura ed un emergente agente zoonotico. Il target del

patogeno sono suinetti post-svezzamento, nei quali si manifesta clinicamente con gravi sintomi sistemici. Sebbene la principale via di trasmissione sia tramite aerosol e contatto nasale con successiva colonizzazione sistemica, recentemente è stato ipotizzato un modello di interazione ospite-patogeno attraverso il tratto gastrointestinale (Ferrando and Schultsz, 2016).

A livello globale sono riconosciuti 35 sierotipi e più di 600 tipi di sequenza: per questo motivo, la complessità e la variabilità genetica di Streptococcus suis rappresentano il problema principale nella realizzazione di un vaccino funzionale nei confronti di diversi ceppi batterici (Goyette-Desjardins et al., 2014)it is a zoonotic agent causing severe infections to people in close contact with infected pigs or pork-derived products. Although considered sporadic in the past, human S. suis infections have been reported during the last 45 years, with two large outbreaks recorded in China. In fact, the number of reported human cases has significantly increased in recent years. In this review, we present the worldwide distribution of serotypes and sequence types (STs. Ne consegue che la terapia antibiotica sia il principale metodo di trattamento degli animali, sebbene numerose resistenze siano state registrate in tutto il mondo (Hadjirin et al., 2021). Per supportarne un utilizzo giudizioso, l'Istituto degli standard clinici e di laboratorio (CLSI) ha definito per il suino le condizioni sperimentali ed i breakpoint clinici di sei antibiotici, quali ampicillina, ceftiofur, entrofloxacina, florfenicolo, penicillina G e tetraciclina (CLSI, 2020). Di fondamentale importanza è quindi cercare di ricorrere ad alternative gli antibiotici, come per esempio acidi organici e composti naturali identici, già ampiamente utilizzati come additivi per mangimi grazie alle loro molteplici proprietà.

Lo scopo dello studio è stato di valutare l'attività antimicrobica di antibiotici convenzionali e sostanze alternative agli antibiotici (acidi organici e composti naturali identici) contro cinque ceppi di campo di *Streptococcus suis* e, in secondo luogo, verificare se la combinazione di queste categorie di sostanze potesse supportare l'azione di antibiotici convenzionali non efficaci.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e condizioni di crescita

Cinque ceppi di campo sono stati acquistati dalla Biobanca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Durante gli esperimenti i ceppi, codificati con i codici 259 (sierotipo 1), 260 (sierotipo 1/2), 701 (sierotipo 3), 702 (sierotipo 12) e 703 (sierotipo 2), sono stati coltivati in brodo Mueller Hinton addizionato di calcio e magnesio (CAMHB) e 5% sangue lisato di cavallo (LHB).

Composti testati

Gli stock degli antibiotici testati (ampicillina, penicillina G, ceftiofur, enrofloxacina, florfenicolo, tetraciclina, doxiciclina, neomicina, tilosina, tiamulina ed amoxicillina) e di acido citrico, acido sorbico, acido benzoico e acido esanoico sono stati preparati in CAMHB. Gli stock di acido ottanoico, acido decanoico, acido dodecanoico, timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo sono stati preparati in etanolo 70% v/v. Tutti gli stock sono stati portati a pH 6.5 e filtrati con filtri $0.2~\mu m$.

Primo esperimento – MIC test composti singoli

Gli antibiotici sono stati testati nei range indicati in Tabella 1. Acido citrico, acido sorbico, acido benzoico ed acido esanoico sono stati testati in diluizioni scalari da 100 a 1.56 mM, mentre acido ottanoico, acido decanoico, acido dodecanoico, timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo da 7.5 a 0.12 mM

Il valore di minima concentrazione inibente (MIC) di antibiotici, acidi organici e composti naturali identici è stato determinato con test di microdiluizione in CAMHB + LHB pH 6.5, attraverso la misurazione dell'assorbanza a 630 nm dopo 24 ore di incubazione in presenza di ogni ceppo di *S. suis* (inoculo corrispondente allo Standard McFarland 0.5). Per ogni sostanza, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa in grado di restituire un'assorbanza nulla dopo 24 ore di incubazione.

Secondo esperimento – combinazioni antibiotici + prototipo

In base ai risultati preliminari, sono stati individuati i composti bioattivi con maggiore attività inibitoria: acido citrico, timolo e acido dodecanoico sono stati utilizzati per preparare un prototipo proprietario di Vetagro SpA. Questo prototipo è stato quindi testato in combinazione ad antibiotici per cui sono state riscontrate maggiori resistenze o elevati valori MIC, ossia tetraciclina, neomicina, tilosina e tiamulina. In particolare, questo secondo esperimento è stato eseguito sul ceppo 703, poiché il sierotipo 2 è uno dei più studiati e diffusi a livello globale (Guo et al., 2021) serotype 2 is most frequently associated with infections in pigs and humans. To better understand the virulence characterization of S. suis serotype 2 (SS2. Con il medesimo metodo sopracitato è stata verificata la variazione di percentuale di crescita batterica in presenza delle combinazioni rispetto alle sostanze singole.

Analisi statistica

I dati del secondo esperimento (combinazioni antibiotico + prototipo) sono stati analizzati con oneway ANOVA seguita dal test Tukey e le differenze sono state considerate significative a $p \le 0.05$.

RISULTATI

MIC test – composti singoli

La distribuzione dei valori MIC degli antibiotici è riportata nella Tabella 1. Secondo i criteri del CLSI, i cinque ceppi di *S. suis* sono risultati sensibili ad ampicillina, penicillina G, ceftiofur e florfenicolo. Tre ceppi sono stati categorizzati come intermedi rispetto alla enrofloxacina ed i due restanti ceppi come sensibili. Infine, quattro resistenze sono state registrate nei confronti della tetraciclina, alla quale il ceppo 703 è risultato intermedio.

Per quanto riguarda gli antibiotici per cui non sono definiti criteri interpretativi standardizzati, la più bassa concentrazione testata (0.5 $\mu g/mL$) è stata individuata come MIC di tutti i ceppi nei confronti di amoxicillina e di quattro ceppi nei confronti di doxiciclina. Valori MIC \geq 16 $\mu g/mL$ sono stati registrati per la neomicina e per il ceppo 701 nei confronti di tilosina e doxiciclina. I valori MIC di tilosina e tiamulina dei restanti ceppi batterici sono risultati compresi tra 1-4 $\mu g/mL$.

	AMP	PEN	CEF	ENR	FLO	TET	DOX	NEO	TYL	TIA	AMX
Range (μg/mL)	0.25- 32	0.12- 16	0.5- 64	0.25- 32	0.5- 64	0.25- 32	0.5- 64	0.5- 64	0.5- 64	0.5- 64	0.5- 64
259	0.25	0.12	0.5	1	2	2	0.5	16	2	4	0.5
260	0.25	0.12	0.5	1	2	2	0.5	16	2	4	0.5
701	0.25	0.12	0.5	0.5	2	> 64	16	16	2	4	0.5
702	0.25	0.12	0.5	0.5	2	4	0.5	32	> 64	1	0.5
703	0.25	0.12	0.5	1	2	1	0.5	16	1	4	0.5

Tabella 1 – Valori MIC in μg/mL dei ceppi di *S. suis* dopo 24 ore in presenza di antibiotici. Secondo i criteri del CLSI i valori in verde, arancione o rosso indicano che il ceppo ricade rispettivamente nelle categorie sensibile, intermedio o resistente. AMP: ampicillina, PEN: penicillina G, CEF: ceftiofur; ENR: enrofloxacina; FLO: florfenicolo; TET: tetraciclina; DOX: doxiciclina; NEO: neomicina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; AMX: amoxicillina. *Table 1* – MIC values in μg/mL of S. suis strains after 24 hours in the presence of antibiotics. According to the CLSI criteria, the values in green, orange, and red indicate that the strain falls into the sensitive, intermediate or resistant category, respectively. AMP: ampicillin, PEN: penicillin G, CEF: ceftiofur; ENR: enrofloxacin; FLO: florfenicol; TET: tetracycline; DOX: doxycycline; NEO: neomycin; TYL: tylosin; TIA: tiamulin; AMX: amoxicillin.

La media di crescita batterica ed i valori MIC di acidi organici e composti naturali identici sono mostrati nella Figura 1. I valori MIC si sono rivelati univoci per i cinque ceppi in esame. La vanillina non ha avuto effetto inibitorio completo sui ceppi batterici alle dosi testate. Al contrario, acido sorbico, benzoico ed esanoico hanno presentato una MIC corrispondente a 100 mM. L'acido citrico e l'acido ottanoico hanno inibito la crescita dei ceppi rispettivamente alle dosi di 50 mM e 7.5 mM. Infine, la MIC di acido decanoico, acido dodecanoico, timolo e carvacrolo è stata registrata a 1.87 mM, mentre quella dell'eugenolo a 3.75 mM.

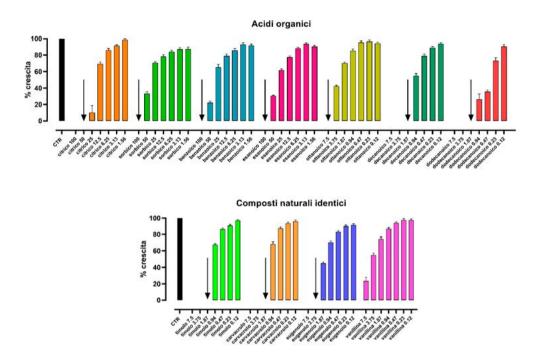


Figura 1 – Crescita dei cinque ceppi di *S. suis* (media dei tre replicati tecnici dei cinque ceppi ± SEM) dopo 24 ore in presenza di acidi organici e composti naturali identici. La crescita batterica è espressa in percentuale rispetto al controllo (media ceppi senza trattamenti). Le concentrazioni di acidi organici e composti naturali identici sono espresse in mM e le frecce indicano le MIC.

Figure 1 – Growth of the five S. suis strains (mean of the three technical replicates of the five strians \pm SEM) after 24 hours in the presence of organic acids and nature identical compounds. Bacterial growth is expressed as a percentage relative to the control (strains without treatments only). Concentrations of organic acids and nature identical compounds are expressed in mM and arrows indicate MIC.

MIC test - combinazioni

L'utilizzo del prototipo costituito da acido citrico, timolo ed acido dodecanoico ha permesso di aumentare l'efficacia degli antibiotici selezionati nei confronti del ceppo 703. La Figura 2 riporta le percentuali di crescita di *S. suis* 703 in presenza delle sostanze singole utilizzate a concentrazioni inferiori alla MIC ed in presenza della combinazione delle stesse concentrazioni. Le sostanze singole si sono confermate non efficaci, mentre le combinazioni hanno permesso complessivamente un'inibizione batterica compresa tra il 74 ed il 92%.

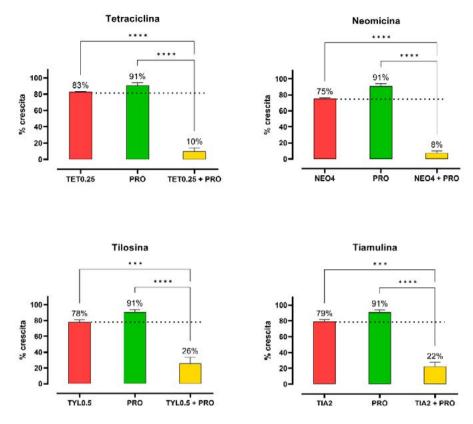


Figura 2 – Crescita di *S. suis* 703 (media dei tre replicati tecnici \pm SEM) dopo 24 ore in presenza di sostanze singole (tetraciclina, neomicina, tilosina, tiamulina e prototipo) e loro combinazioni (antibiotico + prototipo). Le concentrazioni degli antibiotici sono espresse in $\mu g/mL$. I dati sono stati analizzati tramite one-way ANOVA e gli asterischi indicano valori statisticamente significativi (***p \leq 0.001, **** p \leq 0.0001). TET: tetraciclina; NEO: neomicina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; PRO: prototipo.

Figure 2 – Growth of *S. suis* 703 (mean of the three technical replicates \pm SEM) after 24 hours in the presence of single substances (tetracycline, neomycin, tylosin, tiamulin, and prototype) and their combinations (antibiotic + prototype). Concentrations of antibiotics are expressed in μ g/mL. Data were analyzed with one-way ANOVA and asterisks indicate statistically significant values (***p \leq 0.001, **** p \leq 0.0001). TET: tetracycline; NEO: neomycin; TYL: tylosin; TIA: tiamulin; PRO: prototype.

DISCUSSIONE

In questo studio l'attività antimicrobica di antibiotici, acidi organici e composti naturali identici è stata valutata nei confronti di cinque ceppi di campo di *Streptococcus suis* utilizzando la metodologia standardizzata consigliata dal CLSI (CLSI, 2020). Gli antibiotici testati includevano il panel indicato dal CLSI ed altri comunemente utilizzati in suinicoltura. La risposta agli antibiotici è stata variabile a seconda delle diverse classi e, talvolta, anche tra i diversi ceppi. Tutti i ceppi sono risultati sensibili agli antibiotici inibitori della sintesi della parete cellulare, ossia il gruppo delle penicilline (ampicillina, pencillina G, amoxicillina) ed il ceftiofur. Un pattern di sensibilità analogo ed omogeneo è stato registrato nei confronti

del florfenicolo, unico inibitore della sintesi proteica efficace. La risposta dei ceppi nei confronti dei restanti antibiotici è stata invece variabile. L'enrofloxacina, un fluorochinolone che inibisce la sintesi del DNA, è risultata efficace su due ceppi, mentre i restanti sono stati classificati come intermedi. Infine, i quattro inibitori della sintesi proteica sono stati i meno efficaci: quattro ceppi sono risultati resistenti alla tetraciclina e, sebbene nessun intervallo di sensibilità sia ufficialmente definito, i valori MIC di neomicina, tilosina e tiamulina sono risultati essere elevati. A differenza degli antibiotici, acidi organici e composti naturali identici hanno evidenziato un'attività antimicrobica più costante: acido citrico, acido dodecanoico e timolo sono stati combinati in un prototipo testato insieme ad antibiotici non efficaci (tetraciclina, neomicina, tilosina, tiamulina) al fine di valutare il possibile aumento di attività antimicrobica di questi ultimi. Per questo secondo esperimento, il ceppo 703 è stato selezionato tra i cinque ceppi testati in quanto il sierotipo 2 è uno tra i più diffusi ed è il sierotipo di riferimento in numerosi studi bibliografici.

La addizione del prototipo agli antibiotici ha permesso di supportarne l'azione antimicrobica in maniera statisticamente significativa. L'acido dodecanoico ed il timolo hanno un meccanismo di azione simile. L'acido dodecanoico è un acido grasso a media catena con forte azione antimicrobica data dalla permeabilizzazione della membrana batterica e principalmente diretta verso batteri Gram positivi (Casillas-Vargas et al., 2021). Il timolo a differenza dell'acido dodecanoico ha effetto sia su Gram positivi che negativi, distruggendo la membrana batterica tramite la formazione di pori ed inibendo le pompe di efflusso batteriche (Kachur and Suntres, 2020)2020. Infine l'acido citrico, una volta entrato indissociato nel batterio, si dissocia diminuendo il pH intracellulare e causando danni strutturali e funzionali (Burel et al., 2021). Queste tre sostanze potrebbero agire sinergicamente per supportare l'attività antimicrobica dei quattro antibiotici inibitori della sintesi proteica. Il timolo e l'acido dodecanoico potrebbero facilitare l'entrata dei farmaci nella cellula, dopodiché il composto naturale identico potrebbe inibire l'estrusione dei farmaci dalla cellula batterica. andando ad inibire le pompe di membrana. Una volta all'interno del batterio, l'azione degli antibiotici e dell'acido citrico potrebbe ulteriormente agire sinergicamente nell'inibizione della crescita batterica.

CONCLUSIONI

In questo studio la combinazione di un prototipo composto da acido citrico, acido dodecanoico e timolo ha permesso il miglioramento dell'azione di diversi antibiotici rispetto ad un ceppo di campo di *S.suis* sierotipo 2. Ne consegue che questa miscela di acidi organici e timolo possa essere utilizzata per contrastare resistenze ad antibiotici determinate in campo, al fine di combattere il fenomeno dell'antibiotico resistenza.

BIBLIOGRAFIA

- Burel C, Kala A, Purevdorj-Gage L (2021) Impact of pH on citric acid antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. Letters in Applied Microbiology 72(3): 332–340.
- Casillas-Vargas G, Ocasio-Malavé C, Medina S, Morales-Guzmán C, Del Valle RG, Carballeira NM, Sanabria-Ríos DJ (2021) Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. Progress in Lipid Research 82: 101093.
- 3. CLSI (2020) VET01S: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animal 5th Edition.
- 4. Ferrando ML, Schultsz C (2016) A hypothetical model of host-pathogen interaction of Streptococcus suis in the gastro-intestinal tract. Gut Microbes 7(2): 154–162.
- 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. Emerg Microbes Infect 3(6): e45.
- 6. Guo G, Du D, Yu Y, Zhang Y, Qian Y, Zhang W (2021) Pan-genome analysis of Strepto-coccus suis serotype 2 revealed genomic diversity among strains of different virulence. Transbound Emerg Dis 68(2): 637–647.
- 7. Hadjirin NF, Miller EL, Murray GGR, Yen PLK, Phuc HD, Wileman TM, Hernandez-Garcia J, Williamson SM, Parkhill J, Maskell DJ, Zhou R, Fittipaldi N, et al. (2021) Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen Streptococcus suis. BMC Biology 19(1): 191.
- 8. Kachur K, Suntres Z (2020) The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 60(18): 3042–3053.

ARTRITE DA MYCOPLASMA HYORHINIS E MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE IN SUINI CON SEGNI CLINICI DI ZOPPIA -INDAGINI PRELIMINARI

MERENDA M. ¹, CORNAGGIA M. ¹, TONDO A. ¹, FOIANI G. ², BOTTINELLI M. ¹, TONELLI C. ³, MONDIN P. ⁴, VIO D. ⁵, CATANIA S. ¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Verona, Laboratorio di Diagnostica Clinica e Sierologia di Piano, U.O. Micoplasmi, Buttapietra (VR) ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Istopatologia - SCS3, Legnaro (PD)

> ³Medico Veterinario Libero Professionista ⁴Medico veterinario, Huvepharma N.V.

⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Laboratorio di Patologia e Benessere della Specie Suina, Cordenons (PN)

INTRODUZIONE

Il presente contributo descrive il riscontro di *Mycoplasma hyorhinis* (MHR) e *Mycoplasma hyosynoviae* (MHS) da articolazioni di suini con segni clinici di zoppia nella fase di svezzamento e magronaggio conferiti presso l'U.O. Micoplasmi della Sezione di Verona dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

L'insorgenza di zoppia nell'allevamento suino rappresenta un problema di grande impatto in tutte le fasi produttive, sia in termini di riduzione del benessere degli animali che dal punto di vista delle perdite economiche legate alle scarse *performance* produttive, alla riforma prematura degli animali colpiti, al deprezzamento di porzioni o dell'intera carcassa al macello.

Tra le cause di zoppia del suino, le artriti sono molto comuni e possono essere associate a molteplici fattori di rischio, sia infettivi che non infettivi.

Le artriti infettive sono nel suino principalmente causate da agenti batterici in grado di determinare setticemia e raggiungere quindi i siti articolari. Tra questi ricordiamo *Streptococcus suis*, *Glaesserella parasuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus suis*, *Streptococcus spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*. I micoplasmi, nello specifico MHR e MHS, sono altresì annoverati tra le cause di artrite infettiva del suino (1).

MHR è un microrganismo commensale delle alte vie respiratore del suino, isolato comunemente da cavità nasali e polmoni, riconosciuto come agente di polisierosite e artrite in suinetti post-svezzamento; MHS invece colonizza principalmente le tonsille e, in particolari condizioni e con meccanismi ancora non del tutto noti, è in grado di localizzarsi a livello articolare determinando artrite principalmente in suini in accrescimento a partire dalle 10 settimane di età (3).

Le patologie sostenute da tali micoplasmi risultano alle volte sottostimate anche a causa della loro complessità diagnostica, dovuta anche alla particolare difficoltà di isolamento in laboratorio.

MHR e MHS sono considerati patogeni secondari in quanto la loro insorgenza clinica e le lesioni da loro determinate sono generalmente scatenate da fattori predisponenti. L'attuale sistema produttivo può creare le condizioni favorevoli affinché tali microrganismi, che posseggono intrinseche caratteristiche di rapida adattabilità e variabilità genetica, possano determinare l'insorgenza di forme cliniche impattanti. Questo in analogia a quanto già avvenuto nel settore avicolo con la comparsa di un ceppo di *Mycoplasma synoviae* in grado di determinare una nuova forma clinica denominata "anormalità del guscio delle uova" (5).

La descrizione di questo caso clinico vuole contribuire a sensibilizzare il settore suinicolo sul ruolo che alcune specie di micoplasmi rivestono nell'insorgenza di zoppia del suino, al fine

di stimolare l'inserimento di MHR e MHS in diagnosi differenziale e l'utilizzo di metodiche finalizzate all'isolamento del microrganismo.

La collezione di ceppi vitali è infatti di fondamentale importanza per l'allestimento di ulteriori approfondimenti, quali test di antibiotico-sensibilità, genotipizzazione, allestimento vaccini stabulogeni ed eventuali prove sperimentali.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso descritto è stato conferito presso la U.O. Micoplasmi della Sezione Territoriale di Verona nel mese di novembre 2022. I campioni erano costituiti inizialmente da n. 9 arti di suino, sia anteriori che posteriori, appartenenti a soggetti di 60-80gg di vita, con segni clinici di grave zoppia. Successivamente sono state richieste e conferite 3 carcasse di soggetti di 60-80gg di vita e 2 carcasse di soggetti di 110-120gg di vita, al fine di valutare il quadro anatomopatologico in modo completo. Tutti i soggetti selezionati non erano stati sottoposti a terapia antibiotica ed erano stati sacrificati ai fini diagnostici nel rispetto del benessere animale (Reg. UE 1099/2009). L'allevamento di provenienza è un allevamento da riproduzione a ciclo chiuso con 350 scrofe, gestito in bande trisettimanali e *antibiotic-free* nella fase produttiva (dai suinetti in sala parto fino alla macellazione). La rimonta è esclusivamente interna da circa 8 anni. Il veterinario aziendale segnalava una problematica clinica rilevante con presenza di gonfiori articolari, zoppie fino alla perdita di stabilità del treno posteriore che interessava circa il 20% di soggetti per banda, a partire dai 40gg di età e fino ai 110-120gg di età.

La problematica interessava quindi sia il settore svezzamento (28-90gg), che il magronaggio (90-150gg) ed era presente in allevamento da circa 3 mesi.

Il dato anamnestico riportava inoltre precedenti casi di zoppia nelle scrofette in accrescimento alcuni mesi prima dell'inizio della forma clinica nel settore produttivo.

Il protocollo vaccinale prevedeva la vaccinazione dei suinetti per PRRSV, PCV2 e *Mycoplasma hyopneumoniae*, e delle scrofe per PRRSV, Parvovirus, Malrossino, Influenza.

L'allevamento è positivo per PRRSV: in anamnesi veniva riportato un *outbreak* con sintomatologia riproduttiva nel gennaio dello stesso anno ed evidenze periodiche di instabilità rilevate tramite il monitoraggio effettuato su emosieri testicolari.

Indagini di laboratorio

All'esame necroscopico degli arti conferiti in prima istanza si evidenziava gonfiore da moderato a grave delle articolazioni di carpo e/o tarso ed una grave artrosinovite con presenza di abbondante essudato sierofibrinoso in cavità articolare, edema, iperemia e iperplasia della membrana sinoviale (**Fig. 1**).

L'esame necroscopico sulle carcasse ha permesso di confermare il quadro anatomopatologico articolare, che interessava pressochè tutte le articolazioni del treno anteriore e posteriore. Era presente inoltre in tutti i soggetti una imponente linfoadenomegalia generalizzata, abbondante versamento sieroso nelle cavità toracica, pericardica e addominale, broncopolmonite catarrale con epatizzazione dei lobi apicali, medi e parte dei basali. Un soggetto di 60-80gg di vita presentava anche una grave pericardite fibrino-purulenta con ispessimento ed iperemia del pericardio ed abbondante essudato sierofibrinoso in cavità.

Sono stati effettuati esami batteriologici da liquido articolare, milza, polmone, versamento pericardico e addominale. Il protocollo batteriologico era idoneo all'isolamento di patogeni esigenti con particolare riferimento a *Glaesserella parasuis*.

I fluidi articolari ed il versamento pericardico sono stati sottoposti ad esame colturale per la ricerca di *Mycoplasma spp.* ed alla ricerca di *Glaesserella parasuis* con metodica biomolecolare (PCR).

MHR è stato ricercato inoltre con metodica biomolecolare dai polmoni.



Fig. 1 Quadro anatomopatologico macroscopico di artrosinovite sierofibrinosa con iperplasia e congestione della membrana sinoviale.

L'esame colturale per la ricerca di *Mycoplasma spp*. ha permesso di isolare MHR e MHS rispettivamente da 3 e 2 fluidi articolari sui 9 campionati inizialmente. MHR è stato inoltre isolato da fluido articolare di un soggetto e pericardio di 2 soggetti di 60-80gg di vita, compreso il soggetto con grave pericardite fibrinosa.

In un soggetto di 110-120gg di vita è stata evidenziata una coinfezione da MHR e MHS a livello di liquido articolare del tarso.

La ricerca di *Glaesserella parasuis* mediante PCR ha dato esito negativo in tutti i campioni esaminati (fluidi articolari e versamento pericardico)

Le analisi batteriologiche hanno permesso di isolare *Pasteurella multocida* da due polmoni. Per verificare in modo completo lo stato sanitario dei soggetti conferiti è stata indagata la presenza di virus che possano svolgere il ruolo di fattore predisponente per l'insorgenza o l'esacerbazione di infezioni da microrganismi opportunisti.

Le analisi hanno permesso di accertare la presenza di PRRSV e l'assenza di PCV2 rispettivamente da pool di polmoni e di linfonodi inguinali superficiali.

Porzioni di articolazioni (tarso) dalle quali sono stati isolati MHR o MHR+MHS, sono state sottoposte ad esame istologico, evidenziando una diffusa artrite fibrino-purulenta cronico-attiva, da marcata a grave, associata a tenosinovite linfoplasmacellulare, proliferazione fibrovascolare reattiva, iperplasia e focolai di erosione dei sinoviociti (**Fig. 2**).

Nelle sezioni di pericardio del soggetto prima menzionato (MHR-positivo), si osserva inoltre

una grave pericardite fibrino-purulenta e linfoplasmacellulare cronico-attiva, caratterizzata da marcato ispessimento del pericardio viscerale e parietale ad opera di tessuto fibrovascolare reattivo ed estesi tappeti di piccoli linfociti e plasmacellule.

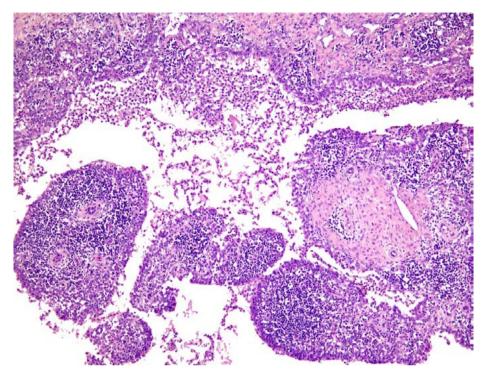


Fig. 2. Immagine istologica di membrana sinoviale (20x). I villi sinoviali sono irregolarmente espansi da un abbondante infiltrato linfoplasmacellulare e da tessuto fibrovascolare reattivo, con iperplasia dei sinoviociti. Si evidenzia inoltre scarso materiale fibrinoso nel lume articolare, frammisto a neutrofili degenerati, macrofagi schiumosi e sinoviociti esfoliati.

Gli isolati di MHR e MHS sono stati sottoposti a verifica del profilo di antibiotico-sensibilità, mediante determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).

Entrambi i microrganismi hanno presentato bassi valori di MIC e sono stati quindi considerati sensibili a Florfenicolo, Lincomicina, Spectinomicina, Spiramicina, Tiamulina, Tilmicosina e Tilosina. Entrambi i ceppi hanno presentato valori elevati di MIC nei confronti di Enrofloxacina ed Eritromicina: tali antibiotici sono stati quindi considerati resistenti. MHS è risultato inoltre resistente a Ossitetraciclina.

Dato che i suini facevano parte di un circuito *antibiotic-free*, il veterinario aziendale ha optato per il trattamento dei riproduttori con Tiamulina 10gg prima e 10gg dopo il parto al fine di ridurre la carica infettante nella fase sottoscrofa.

I risultati preliminari di tale approccio terapeutico sembrano promettenti, e verranno meglio valutati nel prossimo futuro.

Sarà inoltre valutata la possibilità di utilizzo di un vaccino stabulogeno per gestire la problematica nel lungo termine, con la duplice finalità di ridurre la sintomatologia clinica ed evitare trattamenti per il controllo di tale infezione, riducendo quindi anche il rischio di insorgenza di fenomeni di antimicrobico resistenza.

DISCUSSIONE

MHR e MHS sono riconosciuti come agenti di artrite del suino e sono entrambi considerati come microrganismi ubiquitari nella popolazione suina in tutto il mondo.

MHR è un commensale delle alte vie respiratorie, ma può diffondere in presenza di fattori predisponenti e attraverso meccanismi patogenetici ancora non del tutto conosciuti, determinando polisierosite, artrite, aborto, otite e congiuntivite. Viene segnalato inoltre un suo potenziale ruolo nella *Porcine respiratory disease complex* (PRDC) (3).

Studi recenti hanno identificato MHR come il più frequente microrganismo presente in casi di poliartrite batterica del periodo post-svezzamento nel Nord Italia (4), con un riscontro di MHR nel 61.7% dei casi analizzati.

MHS colonizza primariamente le tonsille, e in questo organo può rimanere persistente determinando la presenza di suini portatori fino all'età adulta. Dalle tonsille, anche in questo caso con meccanismi patogenetici ancora non noti, MHS si localizza a livello articolare determinando artrite generalmente in soggetti in accrescimento di età superiore alle 10 settimane.

Le informazioni disponibili sulla epidemiologia di MHS sono scarse, ma i casi di artrite associati all'isolamento di MHS sembrano aumentati negli anni, anche se non è chiaro se questo sia dovuto ad un reale aumento di prevalenza o al miglioramento delle capacità diagnostiche nei confronti di questo microrganismo (3).

Nella realtà italiana già Moronato et al. (2) nel 2017 avevano descritto un grave episodio di zoppia causata da MHS in un allevamento suino a ciclo chiuso.

Nello studio di Salogni et al. (4) la percentuale di riscontro di MHS è pari al 3% dei casi campionati.

Nell'ambito di un progetto di collaborazione tra laboratori che si occupano di isolamento micoplasmi, finalizzata alla raccolta di ceppi di MHS in diversi Paesi Europei, sono emerse differenze interessanti nella percentuale di isolamento di questo microrganismo, con alcuni Paesi in cui la prevalenza sembrerebbe alta in contrapposizione ad altri, come l'Italia, in cui si ha un minore riscontro della presenza di tale microrganismo. Oltre all'ipotesi legata alle differenti tipologie di allevamento nei diversi Paesi Europei, ne emerge un'altra, ancora da confermare, legata al fatto che il trattamento con molecole attive nei confronti di *Mycoplasma spp.*, effettuato per altre patologie della fase di magronaggio-ingrasso, potrebbe in alcune realtà ridurre la carica di MHS e mascherare la sintomatologia. Questo può determinare in alcune aree una sottostima del problema clinico e di conseguenza una scarsità di dati sulla diffusione di MHS.

I micoplasmi sono classicamente definiti "fastidious bacteria" (microrganismi particolarmente esigenti) in quanto la coltura in laboratorio richiede l'utilizzo condizioni di crescita particolari e tempistiche non paragonabili rispetto all'isolamento dei più comuni batteri di interesse diagnostico. L'isolamento colturale dei micoplasmi è infatti una procedura complessa e time-consuming, ma i vantaggi di collezionare ceppi vivi di tali microrganismi sono notevoli. Innanzitutto il ceppo isolato può essere sottoposto a test di antimicrobico-sensibilità al fine di verificare l'appropriatezza del trattamento antibiotico e aiutare il clinico nella scelta oggettiva e consapevole delle molecole antimicrobiche, oltre che monitorare l'insorgenza di fenomeni di resistenza sia a livello di allevamento che di territorio.

La disponibilità di ceppi permette inoltre di poter procedere con studi di caratterizzazione genotipica, utili per comprendere l'epidemiologia dei micoplasmi di interesse per il settore suinicolo, oltre che dare le possibilità di eseguire infezioni sperimentali anche con ceppi di campo, fondamentali per studiarne la patogenesi.

Da ultimo gli isolati di un allevamento potranno anche essere utilizzati per l'allestimento di vaccini stabulogeni, al fine di una gestione delle problematiche infettive più consapevole e

rispettosa dei nuovi obiettivi europei nella logica di una riduzione dell'utilizzo di farmaco ed inserita nel nuovo sistema *One Health*.

MHR e MHS sono considerati patogeni opportunisti; la loro espressione clinica e patogenetica può essere influenzata da fattori predisponenti che, quando presenti, permettono loro di esprimersi dando origine a casi clinici di impatto rilevante per l'allevamento. Nel caso descritto l'assenza di trattamenti antibiotici nella fase produttiva e la circolazione di PRRSV nelle categorie interessate può aver messo in evidenza una forma clinica particolarmente grave e rilevante per la gestione e l'economia aziendale.

Sulla base dei dati recenti su MHR e MHS e delle loro intrinseche caratteristiche si evidenzia l'importanza di mantenere alta l'attenzione al fine di ridurre per quanto possibile il loro adattamento al sistema produttivo italiano e nel contempo di monitorare eventuali variazioni delle espressioni cliniche, sottoponendo campioni appropriati fondamentali per le indagini di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Madson D.M., et al. Nervous and locomotor system. In: Zimmermann JJ et al. eds. Disease of swine. 11th ed. Wiley, 2019: 339-372
- 2. Moronato, ML., Ustulin, M., Vio, D., Nicholas, RAJ., Catania, S. (2017) Diagnosis and control of a severe outbreak of lameness caused by Mycoplasma hyosynoviae in a closed pig unit. Veterinary Record Case Reports 5: e000500.
- 3. Palzer A. et al. *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in pig herds. In: Maes D., et al. eds. Mycoplasmas in swine. 1st edition, 2020: 248-265.
- 4. Salogni C, Capucchio MT, Colombino E, Pozzi P, Pasquali P, Alborali GL. Bacterial polyarthritis in post-weaning pigs in a high-density swine breeding area in Italy. J Vet Diagn Invest. 2022 Jul;34(4):709-711.
- 5. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Gagliazzo L, Moronato ML, Terregino C, Bradbury JM, Ramírez AS. Two strains of Mycoplasma synoviae from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. Vet Microbiol. 2016 Sep 25;193:60-6.

VALUTAZIONE DELLA CONDIZIONE DI ANEMIA DEI SUINETTI AL MOMENTO DELLO SVEZZAMENTO

AN INVESTIGATION OF ANEMIA IN PIGLETS AT WEANING

BINI G. 1, MAZZONI C. 1, SCOLLO A.2

¹ Suivet sas, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia; ²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO);

Parole chiave: anemia, ferro, anemia ferropriva *Keywords*: anemia, iron, iron deficiency anemia

RIASSUNTO

L'anemia del suinetto allo svezzamento è una problematica ben nota che viene affrontata attraverso la somministrazione di ferro iniettabile nei primi 3-5 giorni di vita. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare nella realtà di 20 aziende suinicole di tipo sito 1 del nord Italia, i valori di emoglobina allo svezzamento. Questo dato, è stato inoltre confrontato con diversi parametri aziendali, ricavati tramite questionario, inerenti all'età dei suinetti al momento della somministrazione, dose somministrata, prodotto e numero di interventi, numerosità del parco scrofe, età dei suinetti allo svezzamento e la genetica utilizzata. Inoltre, all'atto del prelievo ematico in EDTA, eseguito su 15 suinetti entro i due giorni che precedevano lo svezzamento, è stato ricavato il peso individuale dei soggetti per valutarne la correlazione con l'emoglobina. Nessuna differenza è stata rilevata dal confronto con i parametri indagati fatto accezione per una correlazione significativa (P-value = 0,021) fra l'ordine di parto della scrofa ed il valore dell'emoglobina dei suinetti. In particolare, la concentrazione di emoglobina (Hb) dei suinetti sembra alzarsi col crescere dell'età della scrofa. Tuttavia, dallo studio sono emersi alcuni aspetti meritevoli di approfondimento quali che nel 20% degli allevamenti sia presente un'anemia conclamata, inoltre dei 300 suinetti analizzati, circa 1'8% presentava valori indicativi di uno stato anemico, il 26% si presentava con valori indice di uno stato carenziale e il 65% con valori adeguati.

ABSTRACT

Piglet anaemia is a well-known problem that is addressed through the administration of injectable iron in the first 3-5 days of life. The purpose of this study was to evaluate the haemoglobin values of piglets at weaning in 20 site 1 type pig farms in northern Italy. This data was also compared with various farm parameters, obtained through a questionnaire, relating to the age of the piglets at the time of administration, the iron dose administered, the product and number of interventions, the number of sows, the age of the piglets at weaning and the genetics. At the time of EDTA blood sampling, performed on 15 piglets within the two days preceding weaning, the individual weight of the subjects was also obtained to evaluate its correlation with haemoglobin. No difference was found from the comparison with the investigated parameters except for a correlation (P-value = 0.021) between the parity order of the sow and the haemoglobin value of the piglets. In particular, the concentration of haemoglobin (Hb) in piglets seems to rise with increasing age of the sow. However, some aspects worthy of further study, emerged from the study such as that in 20% of the farms there is a full-blown anaemia, furthermore of the 300 piglets analysed, approximately 8% had values indicative of an anaemic state, 26% presented with values of a state of deficiency and 65% with adequate values.

INTRODUZIONE

È ben noto che un apporto insufficiente di ferro ai suinetti possa portare ad uno stato di anemia da carenza di ferro dove la concentrazione di emoglobina (Hb), il numero e la dimensione dei globuli rossi diminuiscono al di sotto dei normali range fisiologici. I suinetti, indipendentemente dalla razza e dal tipo genetico, sono suscettibili a questa particolare forma di carenza che può sfociare in uno stato di anemia. Infatti, nascono con riserve molto limitate di ferro, circa 50 mg stoccati sottoforma di emoglobina, questo perché il trasferimento del minerale attraverso la placenta è scarso e la scrofa stessa possiede limitate riserve endogene di ferro. Il latte materno, inoltre, apporta solamente Img al giorno di ferro e i suinetti non hanno più la possibilità di assimilare ferro dal contatto col suolo a causa del confinamento nelle gabbie parto. Infine, le genetiche moderne, a rapido accrescimento, hanno aumentato i fabbisogni di ferro degli animali dal momento che nella prima settimana di vita i suinetti raddoppiano il loro peso e aumentano del 30% il volume ematico circolante. Un suinetto avrebbe bisogno di circa 7mg al giorno di ferro al fine di prevenire l'insorgenza di uno stato carenziale.

Per queste ragioni si interviene con una supplementazione di ferro che viene somministrato per via iatrogena durante i primi giorni di vita dell'animale. Si raccomanda di somministrare almeno 200 mg di ferro destrano per via intramuscolare entro i primi 3 giorni dopo la nascita. Talune volte si ricorre anche alla somministrazione orale ma la via parenterale è quella più utilizzata ed efficace (Szudzik et al, 2018; Svoboda et al, 2017). La concentrazione di emoglobina è il dato più importante a cui fare riferimento per valutare la presenza di un eventuale stato carenziale o anemico. Questa concentrazione dovrebbe essere, al momento dello svezzamento, maggiore di 11 g/dL per essere ottimale. Sempre più di frequente, però, si rinvengono animali con concentrazioni più basse. Fra gli 11 g/dL e i 9 g/dL possiamo parlare di carenza mentre al di sotto di 9 g/dL è possibile parlare di anemia. Spesso questa condizione colpisce i suinetti che raggiungono pesi maggiori al momento dello svezzamento, probabilmente perché hanno tassi di crescita maggiori, e di conseguenza anche fabbisogni maggiori di ferro, a fronte però di una somministrazione di ferro che è standard indipendentemente dalla taglia dell'animale (Svoboda et, 2017; Godyn et al, 2016).

Il dato della concentrazione di emoglobina non viene indagato il più delle volte poiché si ritiene che la somministrazione di ferro poco dopo la nascita sia sufficiente a prevenire il problema. Tuttavia, le genetiche moderne a rapido accrescimento e le covate sempre più numerose, potrebbero richiedere un'implementazione di questa pratica ormai svolta di routine negli allevamenti. Diversi studi hanno già dimostrato che una seconda somministrazione di ferro potrebbe essere utile per migliorare i parametri ematici e anche le performance produttive dei suinetti. Sottovalutare una condizione di anemia subclinica o, peggio ancora di anemia, potrebbe avere importanti conseguenze sul benessere e sulla sanità dei suinetti dal momento che, animali con scarse riserve di ferro, sono più suscettibili a malattie ed infezioni (mostrano una deplezione dei neutrofili e un abbassamento della conta eosinofilica), crescono meno e muojono più facilmente interferendo così, inevitabilmente, sull'economia della filiera produttiva. Un'ulteriore complicazione è legata alla possibilità che nella fase post-svezzamento i suini contraggano il virus della PRRS o il circovirus (PCV2); possibilità estremamente reale visto che i due patogeni sono endemici nella quasi totalità degli allevamenti. A tal proposito, una condizione di anemia o di carenza di ferro pregressa non farebbe altro che peggiorare la sintomatologia respiratoria causata dai due virus, complicando il quadro clinico e rallentando la guarigione degli animali. L'ossigenazione dei tessuti, già parzialmente compromessa dai bassi livelli di emoglobina, verrebbe aggravata dalla condizione patologica a livello polmonare; i due virus, infatti, portano allo sviluppo di una forma interstiziale di polmonite (Bach et al, 2006).

MATERIALI E METODI

Nello studio sono state coinvolte 20 scrofaie del nord-Italia di medie-grandi dimensioni. Nel corso del triennio 20-22 ad ogni allevatore è stato sottoposto un questionario al fine di raccogliere informazioni riguardanti la pratica di supplementazione del ferro. In particolare, è stato chiesto: età dei suinetti al momento della somministrazione, dose somministrata, prodotto (gleptoferrone vs ferro destrano) e numero di interventi. Inoltre, il questionario chiedeva ulteriori informazioni circa la numerosità del parco scrofe. l'età dei suinetti allo svezzamento e la genetica utilizzata in allevamento. Il giorno della visita in allevamento è stato scelto in modo da eseguire il campionamento il più possibile a ridosso della giornata di svezzamento, o comunque entro i due giorni che lo precedevano. Le covate sono state sistematicamente selezionate escludendo dall'analisi i suinetti con evidenti problemi come ad esempio ascessi, ernie, zoppie o condizioni corporee scadenti (soggetti troppo magri o visibilmente affetti da patologie). Per ogni azienda sono stati selezionati 15 suinetti appartenenti a covate diverse; ognuno di essi è stato pesato con un dinamometro analogico e sottoposto a prelievo ematico dalla vena giugulare per testare il livello di emoglobina. Il sangue è stato raccolto in provette contenenti EDTA. Inoltre, per ogni animale analizzato, è stato riportato l'ordine di parto della madre e il giorno di lattazione al momento del prelievo.

I valori dell'emoglobina sono stati analizzati singolarmente il giorno stesso o il giorno immediatamente successivo la raccolta usando un dispositivo portatile, HemoCue201⁺, ovvero un fotometro in grado di rilevare la concentrazione di emoglobina in un piccolo campione ematico. Per valutare la prevalenza di carenza di ferro e di anemia nei suinetti allo svezzamento si è utilizzata la classificazione riportata in letteratura, dove lo stato di anemia si identifica in funzione di un range di concentrazione di emoglobina (Bhattarai e Nielsen, 2015; Perri et al, 2016).

I dati raccolti dal questionario e dal campionamento sono stati inseriti in tabelle Excel. L'analisi statistica è stata effettuata tramite il programma XLSTAT2022. Le analisi eseguite sono non parametriche utilizzando metodica Kruskal-Wallis. Il test di correlazione è stato fatto con metodica Spearman.

RISULTATI

In totale sono stati prelevati e pesati 300 suinetti provenienti da 20 allevamenti diversi. Tutti gli allevamenti utilizzavano genetiche moderne iper-prolifiche; nessuno degli allevatori coinvolti utilizzava la genetica tradizionale.

Per ogni allevamento è stata calcolata la prevalenza di soggetti con anemia conclamata (Hb≤9g/L), carenza di ferro (9<Hb<11g/L) o con normali concentrazioni di emoglobina (Hb≥11g/L) (grafico 1). È stata inoltre calcolata la prevalenza sul totale degli animali analizzati (grafico 2).

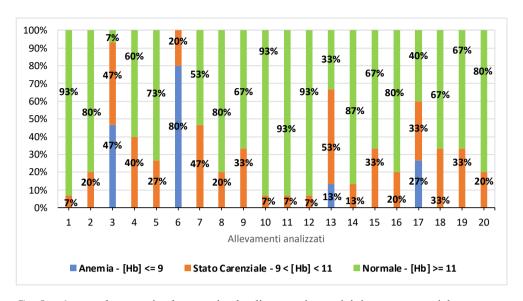


Grafico 1: prevalenze, azienda per azienda, di soggetti anemici, in stato carenziale e con normali livelli di emoglobina (Hb).

Graph 1: prevalence, in each farm, of anemic piglets, piglets with iron deficiency and piglets with normal hemoglobin ranges (Hb).

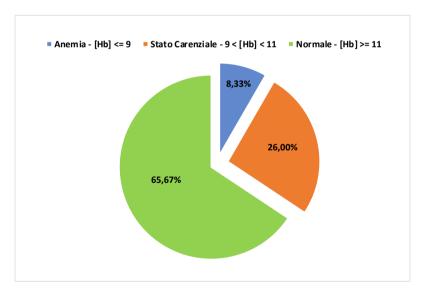


Grafico 2: andamento globale delle prevalenze delle condizioni relative alle concentrazioni di emoglobina (Hb) nei 300 suinetti analizzati.

Graph 2: total prevalence of hemoglobin-related (Hb) conditions in the 300 piglets involved in the study.

Successivamente è stata ricercata la presenza di una correlazione fra il valore di emoglobina registrato per ogni animale analizzato e altri parametri raccolti durante il campionamento e grazie alla compilazione del questionario. Non è stata evidenziata nessuna correlazione

statisticamente significativa fra la concentrazione di emoglobina e la genetica utilizzata in allevamento, la tipologia di ferro somministrata, il peso degli animali al momento del prelievo e i giorni di lattazione. Tuttavia, è emersa una correlazione significativa (P-value = 0,021) fra l'ordine di parto della scrofa ed il valore dell'emoglobina dei suinetti. In particolare, la concentrazione di Hb dei suinetti incrementa col crescere dell'età della scrofa.

Parametro	Giorni di lattazione	Ordine di parto	Peso medio	Emoglobina
Giorni di lattazione	/	0,018	<0,0001	ns
Ordine di parto	0,018	/	ns	0,021
Peso medio	<0,0001	ns	/	ns
Emoglobina	ns	0,021	ns	/

Tabella 1: correlazione fra la concentrazione di emoglobina (Hb), i giorni di lattazione, il peso e l'ordine di parto della scrofa. P-values < 0,05 sono stati considerati significativi. Ns = P-value non significativo.

Table 1: correlation among hemoglobin concentration (Hb), days of lactation, average weight of the piglets, and sow parity. P-values <0.05 were considered as significative. Ns = not significative P-value.

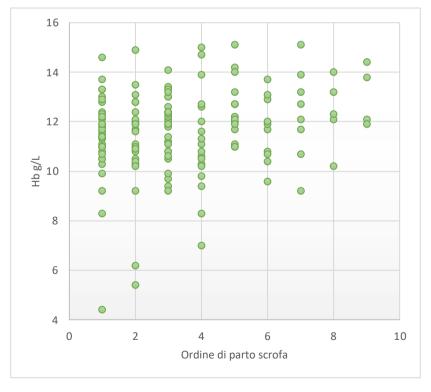


Grafico 3: distribuzione dei valori di emoglobina in funzione dell'ordine di parto della scrofa.

Graph 3: Hemoglobin values distribution considering the sow parity.

DISCUSSIONE

Dai grafici riportati si evince come in tutti gli allevamenti analizzati vi sia almeno un animale in stato carenziale fra quelli campionati. Nel 20% degli allevamenti sono stati trovati animali con anemia conclamata, nel restante 80% le concentrazioni di emoglobina sono più alte ma non tutti gli animali presentano valori sopra a 11 g/L, soglia che definisce uno stato carenziale. Sul totale dei 300 suinetti analizzati, circa l'8% presentava valori indicativi di uno stato anemico, il 26% si presentava con valori indice di uno stato carenziale e il 65% con valori adeguati. Questo significa che più del 30% degli animali non ha valori adatti. Queste prevalenze sono molto simili a quelle riportate in letteratura (Kubik et al, 2015; Perri et al, 2016; Sperling et al, 2021).

La correlazione statisticamente significativa emersa nel presente studio fra l'ordine di parto della scrofa e la concentrazione di emoglobina della prole sottolinea la necessità di eseguire maggiori studi in quanto la letteratura riporta dati contrastanti. Alcuni studi (Sperling et al, 2021; Pineiro et al, 2019) sono in linea col presente, dove all'aumentare dell'ordine di parto della scrofa i suinetti presentano valori di emoglobina maggiori mentre altri mostrano una tendenza totalmente opposta (Kim et al, 2018; Peters e Mahan, 2008; Gannon et al, 2011). Il dato ricavato da questo studio potrebbe derivare dal fatto che scrofe più giovani hanno una maggiore richiesta di nutrienti e spesso vengono inseminate per la prima volta prima che abbiano raggiunto la completa maturazione, sia in termini di peso corporeo che di lardo dorsale. Pertanto, parte dei nutrienti che vengono assunti durante la gestazione vengono utilizzati per la propria crescita anziché essere trasferiti ai feti. Questo sottolinea l'importanza di dedicare ai figli delle scrofe molto giovani delle attenzioni aggiuntive, classificandoli all'interno di una classe maggiormente a rischio di anemia.

Dall'analisi effettuata non è emersa una correlazione fra la concentrazione di emoglobina e la genetica utilizzata negli allevamenti. Gli allevamenti coinvolti nello studio utilizzano ibridi commerciali con genetiche moderne e performanti; la tendenza è quella di utilizzare linee genetiche iper-prolifiche e pertanto la variabilità che si può ottenere in questo senso è limitata. Anche la tipologia di ferro utilizzato, gleptoferrone piuttosto che ferro destrano, non sembra avere un impatto sui valori di emoglobina. In letteratura la maggior parte degli studi riporta l'utilizzo di ferro destrano; diverse ricerche hanno tuttavia dimostrato l'equipollenza dei due principi attivi, non individuando differenze nell'utilizzo di uno piuttosto che l'altro (Vermeer et al, 2002; Sperling et al, 2018).

Non si evidenziano correlazioni significative neanche fra concentrazione di emoglobina e peso dell'animale, sebbene molti autori concordino sul fatto che un peso maggiore dell'animale al momento dello svezzamento sia un fattore di rischio per lo sviluppo di anemia (Szudzik et al, 2018; Svoboda et al, 2017). Tuttavia, la concentrazione di emoglobina non riflette sempre in maniera precisa lo stato dell'animale in quanto l'emoglobina è l'ultima delle riserve di ferro ad essere intaccata. Non si può escludere, pertanto, che questi animali mostrassero altre alterazioni ematiche associate all'anemia o a uno stato di carenza pur avendo valori di emoglobina adeguati.

CONCLUSIONE

I dati ottenuti da questo studio, assieme a quelli già presenti in letteratura, ci forniscono due spunti. In primo luogo, possiamo senz'altro affermare che negli odierni sistemi di allevamento, probabilmente a causa di genetiche spinte ed accrescimenti elevati, la prevalenza di uno stato carenziale di ferro, che può eventualmente sfociare in una forma conclamata di anemia, è alta. In particolare, negli animali nati da scrofe giovani. A fronte di questo dato è prassi comune intervenire con un'iniezione di ferro nei primissimi giorni dopo la nascita. Tuttavia, un solo intervento potrebbe non essere sufficiente per garantire

un'uniforme e adeguato livello di emoglobina a tutti gli animali. Una percentuale di soggetti non possiede comunque idonee riserve di ferro per non rischiare di sviluppare una successiva forma anemica da carenza. A tal proposito sarebbe buona prassi indagare, a livello di singolo allevamento, lo stato degli animali per capire se l'introduzione di una seconda iniezione prima dello svezzamento potrebbe avere influenza positiva. La tendenza è invece quella di dare per scontato che un unico intervento sia sufficiente, senza indagarne l'effettiva efficacia. Questa valutazione potrebbe essere svolta direttamente dal veterinario aziendale tramite l'utilizzo di un dispositivo portatile come quello utilizzato per questo studio.

In secondo luogo, questo studio fornisce spunti interessanti per svolgere future ricerche. Abbiamo trovato una correlazione fra la concentrazione di emoglobina dei suinetti e l'ordine di parto della scrofa ma confrontando il nostro risultato con la letteratura sono emerse delle discordanze che vanno approfondite, anche svolgendo ricerche sulla condizione di anemia delle scrofe. D'altro canto, bisogna comprendere al meglio la relazione fra peso dell'animale e concentrazione di emoglobina; molti studi hanno evidenziato una correlazione fra i due dati (Peters e Mahan, 2008; Steinhardt et al, 1984). A tal proposito, però, c'è da considerare che il solo valore legato all'emoglobina non è sempre indicativo ma sarebbe utile valutare altri parametri ematici che invece nella clinica del suino non vengono mai indagati.

Possiamo quindi concludere che servono ulteriori ricerche e studi più approfonditi, ma senz'altro la carenza di ferro è un problema che esiste nell'allevamento suino e affligge una percentuale importante di animali che corrono il rischio di diventare anemici. Un'ulteriore supplementazione di ferro sarebbe utile a migliorare i parametri ematici e probabilmente, alla luce delle evidenze bibliografiche, anche a migliorarne le performance.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Bach, J. E., Nielsen, J. P., Kristensen, C. S., & Stege, H. (2006). Effects of an additional iron injection in PMWS positive hear in respect to hematocrit, hemoglobin and growth rate. In Proc. IPVS (p. 565).
- 2. Bhattarai, S., & Nielsen, J. P. (2015). Association between hematological status at weaning and weight gain post-weaning in piglets. Livestock Science, 182, 64-68.
- 3. Bhattarai, S., & Nielsen, J. P. (2015). Early indicators of iron deficiency in large piglets at weaning. Journal of Swine Health and Production, 23(1), 10-17.
- 4. Gannon, K.M., Frey, B., Payne, H.G., Mullan, B.P., 2011. A survey of sow haemoglobin by parity in Western Australia. In: van Barneveld, R.J. (Ed.), Manipulating Pig Production XIII. Australasian Pig Science Association, Werribee, Vic (p. 86).
- 5. Gillespie, T. 2019. What is IDA? Experience and success factors used to eliminate iron deficiency anemia and achieve peak performance that lasts a pigs lifetime. In: 50th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians Orlando, FL. p 156-158.
- 6. Godyń, Dorota, et al. "Diagnostics of iron deficiency anaemia in piglets in the early postnatal period-a review." Animal Science Papers & Reports 34.4 (2016).
- 7. Kim, J. C., Wilcock, P., & Bedford, M. R. (2018). Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: A review. Animal Feed Science and Technology, 235, 8-14.
- 8. Kubik A., T. O'Sullivan, J. Harding and R. Friendship. 2015. An investigation of iron deficiency and anaemia in piglets. Proceedings of 34th Annual Centralia Swine Research Update. 28 January 2015. I-1-I2.
- 9. Perri, A. M., Friendship, R. M., Harding, J. C., & O'Sullivan, T. L. (2016). An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on postweaning performance. Journal of Swine Health and Production, 24(1), 10-20.

- 10. Peters JC, Mahan DC 2008: Effects of neonatal iron status, iron injections at birth, and weaning in young pigs from sows fed either organic or inorganic trace minerals. J Anim Sci 86: 2261-2269
- 11. Piñeiro, C., Manso, A., Manzanilla, E. G., & Morales, J. (2019). Influence of sows' parity on performance and humoral immune response of the offspring. Porcine health management, 5(1), 1-8.
- 12. Sperling, D., Freudenschuss, B., Shrestha, A., Hinney, B., Karembe, H., & Joachim, A. (2018). Comparative efficacy of two parenteral iron-containing preparations, iron gleptoferron and iron dextran, for the prevention of anaemia in suckling piglets. Veterinary Record Open, 5(1), e000317.
- 13. Sperling, D., Guerra, N., & Dimitrov, S. (2021). Iron Deficiency Anemia (IDA) in sowsan emerging problem. Zhivotnovadni Nauki, 58(5), 47-52.
- 14. Sperling, D., Karembe, H., Suarez, P., Guerra, N., & Lopez, A. (2021 a). Field evaluation of hemoglobin (HB) level in piglets at weaning on European farms. In: Proceeding 12th European symposium of porcine health management, April 14 -16, Bern, Switzerland
- 15. Steinhardt M, Bünger U, Furcht G 1984: Zum Eisenbedarf des Schweines in den ersten 2 Lebensmonaten. Arch Exper Vet Med 38: 497-515
- 16. Svoboda, M., Vaňhara, J., & Berlinská, J. (2017). Parenteral iron administration in suckling piglets–a review. Acta Veterinaria Brno, 86(3), 249-261.
- 17. Szudzik, M., Starzyński, R. R., Jończy, A., Mazgaj, R., Lenartowicz, M., & Lipiński, P. (2018). Iron supplementation in suckling piglets: An ostensibly easy therapy of neonatal iron deficiency anemia. Pharmaceuticals, 11(4), 128.
- 18. Vermeer JE, Kuijpers AH, Elbers AR 2002: Comparison of the efficacy of two different iron supplements for anemia prevention in piglets. Tijdschr Diergeneeskd 127: 110-104

RUOLO DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) E DEL VIRUS DELLA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA DEL SUINO (PRRSV) NEL CONTESTO DEL COMPLESSO DELLE MALATTIE RESPIRATORIE DEL SUINO (PRDC) IN ITALIA

ROLE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) AND PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) IN PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (PRDC) IN ITALY

D'ANNUNZIO G.¹, OSTANELLO F.², MUSCATELLO L.V.², ORIOLES M.³, JACUMIN N.⁴, TOMMASINI, N.⁴, LEOTTI G.⁴, LUPPI A.¹, ALBORALI L. G.¹, MANDRIOLI L.², SARLI G².

¹Isituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e della Emilia-Romagna ²Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna ³ Dipartimento di Scienze agroalimentari, ambientali e animali dell'Università di Udine ⁴Boehringer Ingelheim Animal Health Italia SpA

Parole chiave: istopatologia, PCVD, PRRSV, PRDC

Keywords: histopathology, Porcine Circovirus Disease, Porcine Respiratory Disease Complex

RIASSUNTO

In questa indagine, su 79 casi di Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) provenienti da 22 diversi allevamenti del Nord Italia, è stato indagato il ruolo di PCV2 e PRRSV nel determinismo della malattia attraverso lo studio istologico ed immunoistochimico delle lesioni. Il campionamento di polmone, ma anche di tessuti linfoidi (linfonodi inguinale superficiale e tracheo-bronchiale, milza, tonsilla) ed ileo per gli esami istopatologici ai fini della diagnosi delle Porcine Circovirus Disease (PCVD) ha consentito, nei casi PCV2+ nel polmone, di concludere per forme sistemiche di malattia (PCV2 systemic disease – PCV2-SD) quando i soggetti presentavano lesioni e positività anche nei tessuti linfoidi, seppure la sintomatologia clinica fosse per tutti di tipo respiratorio. Nel 63,6% dei casi positivi a PCV2 a livello polmonare è stata riscontrata anche una deplezione linfoide in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati. Nella casistica esaminata, a fronte di una sintomatologia respiratoria comune a tutti i soggetti, una alta percentuale di casi era in realtà riconducibile a forme sistemiche di malattia da PCV2. Per evitare di sottostimare il danno indotto dal PCV2 in allevamento è necessario condurre un campionamento non limitato al solo polmone per differenziare la forma sistemica di malattia che, viceversa, in assenza di altri segni tipici, potrebbe non essere correttamente individuata. L'infezione da PCV2, insieme a quella da PRRSV, rimangono tra le principali cause di PRDC in Nord Italia, impattando sulla sanità della mandria: in campo le co-infezioni aggravano il quadro patologico, ed il loro controllo necessita la scelta delle misure più appropriate sulla base delle evidenze anatomopatologiche ed analitiche.

ABSTRACT

This study aimed to investigate through histological and immunohistochemical evaluation the pathological role of PCV2 and PRRSV on 79 cases of Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) gathered from 22 farms in Northern Italy. Thanks to appropriate sampling (lung, inguinal and trachea-bronchial lymph nodes, spleen, tonsil and ileum) for circovirus-associated diseases (PCVD) diagnosis, the methods could detect lesions and antigens in lymphoid tissues and in the lung. Results show that 63.6% of PCV2-positive cases had

lymphoid depletion in at least one of the examined lymphoid tissues in addition to pulmonary lesions. Thus, these were consequently classified as PCV2 systemic diseases (PCV2-SD). In this case series, despite the clinical manifestation of respiratory symptoms, a higher percentage of cases were attributable to systemic forms of PCV2 disease. In conclusion, appropriate sampling is crucial in the absence of typical signs to avoid underestimating the damage induced by PCV2 in farms and overlooking the systemic form of the disease. PCV2 and PRRSV remain among the primary infections linked to PRDC in Northern Italy, affecting farm health. Therefore, co-infections can significantly aggravate the pathology in the field, making it necessary to choose appropriate control measures.

INTRODUZIONE

L'espressione "complesso delle malattie respiratorie del suino" (*Porcine Respiratory Disease Complex* – PRDC) descrive l'insieme di forme cliniche di polmoniti causate dall'interazione di fattori eziologici (virali e batterici), ambientali, manageriali e genetici, che provoca significative perdite economiche negli allevamenti intensivi (Opriessnig et al., 2011).

La natura polimicrobica della PRDC complica la diagnosi e il tentativo di determinare quali virus o batteri siano i principali responsabili del problema respiratorio osservato in allevamento. La diagnosi su base clinica è limitata dal fatto che le forme a eziologia virale sono complicate dall'effetto di infezioni batteriche concomitanti o secondarie, e che i segni clinici sono spesso molto simili anche quando virus diversi colpiscono l'apparato respiratorio (Janke, 1995). La complessità delle interazioni tra patogeni rende dunque difficile lo studio della PRDC, la diagnosi eziologica, la prevenzione ed il controllo della malattia (Opriessnig et al., 2011), (Sunaga et al., 2020).

In caso di sospetta PRDC può essere utilizzata un'ampia gamma di test diagnostici diretti o indiretti, i primi per l'individuazione di un patogeno durante l'infezione, i secondi per il monitoraggio nel tempo delle infezioni in un allevamento (Giles et al., 2017). La diagnosi diretta delle infezioni virali viene attualmente eseguita con metodi molecolari come la PCR qualitativa (PCR), la PCR quantitativa (qPCR) o la PCR multiplex (Christopher-Hennings et al., 2019; Hernandez-Garcia et al., 2017; Trang et al., 2018, 2014; Lung et al., 2017; Sunaga et al., 2020). Sebbene le metodiche biomolecolari siano altamente sensibili, non permettono di discriminare la semplice infezione dalla malattia (Maes et al., 2014). Inoltre a causa della natura endemica ed ubiquitaria della maggior parte dei patogeni coinvolti nella patologia respiratoria del suino, non sempre l'isolamento/identificazione di un particolare microrganismo è correlato al fatto che questo sia direttamente coinvolto nello sviluppo della malattia e/o associato alle lesioni presenti (Yaeger and Alstine, 2019). In questo contesto, le indagini istopatologiche devono essere considerate come importanti strumenti per assegnare il giusto ruolo agli agenti eziologici individuati: la possibilità di colocalizzare l'agente eziologico con le rispettive lesioni caratteristiche grazie all'impiego di tecniche immunoistochimiche (IHC) o di ibridazione in situ (ISH) permette di oggettivare il ruolo svolto dal patogeno nel determinismo della malattia (Sarli et al., 2021).

L'infezione da PCV2 è stata associata a forme respiratorie di malattia e a lesioni polmonari interstiziali di tipo istiocitario/granulomatoso fin dai primi anni della sua scoperta come agente causale della sindrome da deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS) (Harms et al., 2002; Kim et al., 2004; Ségales et al., 2004), e successivamente nelle forme di polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) in associazione ad altri agenti virali (Ellis et al., 2004; Grau-Roma and Segalés, 2007; Morandi et al., 2010). Pertanto, la forma respiratoria è stata annoverata tra le *Porcine circovirus diseases* (PCVD) con la nomenclatura di *PCV2*-

associated respiratory disease (Opriessnig et al., 2007) o PCV2 lung disease (PCV2-LD) secondo Segalés, (2012) (Tabella 1).

Tabella 1. Nomenclatura delle malattie associate all'infezione da Circovirus suino tipo 2. Confronto della letteratura secondo Opriessnig et al., 2007 e Segalés, 2012.

Table 1. Terminology for porcine circovirus diseases. Literature comparison according to Opriessnig et al., 2007 and Segalés, 2012.

Diseases	Porcine circovirus diseases – PCVD Segalés, 2012	Porcine circovirus associated diseases – PCVAD Opriessnig et al., 2007	
Subclinical infection	PCV2 subclinical infection «PCV2-SI»	PCV2-subclinical infection	
Posweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)	PCV2 systemic disease «PCV2-SD»	PCV2-systemic infection	
Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS)	PCV2-PDNS	PCV2-PDNS	
Reproductive failure	PCV2 reproductive disease «PCV2-RD»	PCV2-reproductive failure	
PRDC – PNP	PCV2 lung disease «PCV2-LD»	PCV2-associated respiratory disease	
Necrotizing limphadenitis	Necrotizing lymphadenitis	Necrotizing lymphadenitis	
Granulomatous enteritis	PCV2 enteric disease «PCV2-ED»	PCV2-enteritis	

Tuttavia, sussiste una potenziale sovrapposizione tra la forma esclusivamente respiratoria e la forma sistemica da PCV2, definita come PCV2 systemic disease (PCV2-SD) (Segalés, 2012), poiché la sintomatologia respiratoria può essere presente anche nelle forme sistemiche di infezione.

Sebbene, nel tempo, PCV2 si sia riconfermato come importante patogeno coinvolto nella PRDC (Fablet et al 2012; Hansen et al 2010; Paz-Sánchez et al 2021; Wellenberg et al., 2010), si ritiene che la PCV2-LD sia in realtà un'entità trascurabile in allevamento e che la maggior parte dei casi clinicamente diagnosticati come casi di PRDC associati a PCV2, con l'analisi concomitante dei tessuti linfoidi, si configurino invece come forme di PCV2-SD caratterizzate quindi anche da deplezione linfocitaria nei distretti linfoidi dell'organismo (Segalés and Sibila, 2022; Ticó et al., 2013).

È noto che lo sviluppo di PCVD è favorito da co-infezioni di natura virale o batterica che sperimentalmente consentono di riprodurre in maniera più efficiente la malattia, e che sono altresì di frequente riscontro anche in condizioni di campo associate a forme cliniche e a lesioni più gravi (Opriessnig and Halbur, 2012; Ouyang et al., 2019). In particolare, nelle forme cliniche respiratorie è molto comune la co-infezione PCV2/PRRSV (Burgara-Estrella et al., 2012; Drolet et al., 2003; Fan et al., 2013; Harms et al., 2001; Zeng et al., 2014). PRRSV è annoverato tra i patogeni virali primari della PRDC. Insieme a PCV2 i due virus sono responsabili principalmente di un'azione immunosoppressiva sulle cellule del

sistema immunitario che determina un'alterazione delle difese dell'ospite predisponendolo a infezioni secondarie batteriche e virali (Chase and Lunney, 2019; Loving et al., 2015; Lunney et al., 2016; Niederwerder et al., 2016). L'interazione tra i due agenti patogeni nel potenziare le manifestazioni cliniche di malattia evidenzia l'importanza della diagnosi accurata e del controllo dei due virus in allevamento.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di indagare il ruolo di PCV2 in casi di PRDC osservati in 22 allevamenti del Nord Italia. Lo studio è stato condotto sul polmone ma anche su diversi distretti linfoidi dell'organismo per poter stimare quante delle forme respiratorie osservate potevano essere classificate come malattia respiratoria associata a PCV2 o essere viceversa riconducibili a quadri di infezione e malattia sistemica da PCV2. Sulla stessa casistica è stato valutato l'eventuale ruolo di PRRSV (da solo o in associazione con PCV2) nel determinismo delle forme di PRDC esaminate nel corso dello studio.

MATERIALI E METODI

La casistica si compone di 79 suini di oltre 4 settimane di età appartenenti a gruppi di animali con anamnesi di PRDC e provenienti da 22 allevamenti del Nord Italia. I suini erano deceduti a seguito di sintomatologia respiratoria o sacrificati a fini diagnostici. Tutte le aziende incluse prevedevano misure di profilassi vaccinale nei confronti del PCV2 e 4 riportavano problemi clinici correlati a PRRSV. Tutti i suini sono stati sottoposti a necroscopia durante la quale sono stati prelevati e fissati in formalina campioni di tessuto per l'esame istopatologico, tra cui in particolare polmone, tonsilla, linfonodo tracheobronchiale e/o mediastinico, milza, ileo e linfonodo inguinale superficiale come previsto dal campionamento *standard* per le indagini relative alla ricerca di PCV2 nei tessuti.

Istologia ed immunoistochimica

I tessuti fissati in formalina sono stati processati per l'allestimento dei preparati istologici. Le sezioni dei diversi tessuti sono state esaminate per la valutazione qualitativa delle lesioni microscopiche. Nel polmone le lesioni sono state classificate secondo i criteri di Caswell and Williams (2015) come: broncopolmonite, polmonite interstiziale, polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP), pleuropolmonite fibrinosa. Le lesioni sono state registrate come singole o combinate quando sono stati osservati, rispettivamente, uno o più tipi di lesione. Nei tessuti linfoidi, le lesioni sono state classificate in iperplasia linfoide o deplezione linfoide (Valli et al., 2015); il quadro istologico è stato considerato nella norma (NN) in caso di tessuto linfoide normotrofico ed assenza di iperplasia.

Parallelamente alla colorazione con ematossilina eosina, sezioni di 3 µm di spessore degli stessi tessuti esaminati (polmone, tonsilla, linfonodo tracheobronchiale e/o mediastinico, milza, ileo e linfonodo inguinale superficiale), mentre per l'indagine sul PRRSV solo il polmone, sono stati sottoposti ad esame immunoistochimico rispettivamente per PCV2 e PRRSV. I dettagli del protocollo immunoistochimico utilizzato sono riportati in Tabella 2. Come controlli positivi sono state impiegate sezioni di linfonodo e polmone precedentemente individuati come positivi per la presenza degli antigeni di PCV2 e PRRSV.

Tabella 2. Immunoistochimica (IHC), materiali e metodi. **Table 2**. Immunohistochemistry (IHC), materials and methods.

Agente eziologico	Anticorpo primario (tipo e clone)	Fornitore	Diluizione/ incubazione	Smascheramento siti antigenici	Sistema di rivelazione
PCV2	mAb 36A9, Isotipo: IgG ₂ a Anti-VP2 PCV2	Ingenasa, Madrid, Spain	1:1500 overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C	CRF Anti- Polyvalent HRP Polymer - ScyTek Laboratories
PRRSV	1AC7, Isotipo: IgG ₂ a Specifico per proteina N	Ingenasa, Madrid, Spain	1:500 overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C	CRF Anti- Polyvalent HRP Polymer - ScyTek Laboratories

Nel polmone, la reazione IHC per PCV2 è stata considerata positiva in caso di colorazione granulare marrone del citoplasma dei macrofagi alveolari ma anche dei monociti, delle cellule epiteliali bronchiali, delle cellule endoteliali e delle cellule dendritiche centrofollicolari nei tessuti linfoidi (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012; Ticó et al., 2013). L'IHC per PRRSV è stata considerata positiva in caso di colorazione marrone nel citoplasma dei macrofagi alveolari, degli pneumociti di tipo II e nelle cellule epiteliali bronchiali (Grau-Roma and Segalés, 2007; Han et al., 2012; Zimmerman et al., 2019).

Criteri diagnostici

I quadri di polmonite associati alla positività nel polmone e/o nei tessuti linfoidi per PCV2 sono stati considerati come PCVD. Partendo dal presupposto che i soggetti inclusi nello studio erano tutti casi con sintomatologia respiratoria e diagnosi clinica di PRDC, secondo gli attuali criteri diagnostici per la definizione di ciascun caso di PCVD (Segalés and Sibilia, 2022), i casi con polmoni positivi per PCV2 e concomitante presenza di deplezione linfocitaria da moderata a grave nei tessuti linfoidi associata ad una quantità da moderata ad elevata del virus nei tessuti linfoidi sono stati considerati indicativi di forma sistemica di malattia da PCV2 (PCV2-SD).

I casi che presentavano polmoni e/o tessuti linfoidi positivi per PCV2 e lesioni istopatologiche minime (iperplasia linfoide) o assenti, sono stati invece considerati come casi di PRDC dove l'infezione da PCV2 ha avuto un ruolo attivo (PRDC/PCV2+), in considerazione dell'indicazione di non considerare più la PCV2-LD tra le PCVD (Segalés and Sibilia, 2022).

RISULTATI

Nei 79 casi di PRDC esaminati la principale lesione polmonare osservata è stata la polmonite interstiziale, con o senza evidenza concomitante di broncopolmonite. In particolare, sono stati osservati: 44 casi (55,7%) di polmonite interstiziale pura (Figura 1A); 17 casi (21,5%) di broncopolmonite (Figura 1B) associata a polmonite interstiziale; 8 casi (10,1%) di polmonite proliferativa e necrotizzate (PNP) (Figura 1C); 2 casi (2,5%) di PNP associata a polmonite interstiziale e concomitante broncopolmonite essudativa; 2 casi (2,5%) di pleuropolmonite fibrinosa; 2 casi di broncopolmonite pura (2,5%); 1 caso di broncopolmonite con concomitante polmonite interstiziale e pleuropolmonite

(1,3%); 2 casi con evidenza di sola congestione ed emorragie polmonari (2,5%); 1 caso di broncopolmonite riconducibile macroscopicamente e microscopicamente a polmonite enzootica (1,3%).

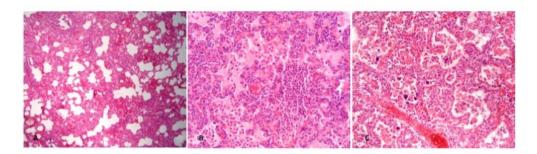


Figura 1. Lesioni polmonari, ematossilina eosina. A) polmonite interstiziale, caso 25057, 63×; B) Broncopolmonite essudativa: essudazione di neutrofili e macrofagi negli alveoli, caso 25058, 250×; C) Polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP), caso 26104, 250×. Figure 1. Pulmonary lesion, hematoxylin eosin stain. A) Interstitial pneumonia, case 25057, 63×; B) Bronchopneumonia: alveolar exudation of neutrophils and macrophages, case 25058, 250×; C) Proliferative and necrotizing pneumonia (PNP), case 26104, 160× and 400× respectively.

Dei 79 casi di PRDC, 44 (55,7%) sono risultati positivi all'IHC per PCV2 (nel polmone o in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati) e 34 (43,0%) all'IHC per PRRSV (Figura 2). Nel 20,3% dei casi è stata osservata una positività in IHC per entrambi i virus. In 17 casi (21,5%) nessuno dei due virus è stato rilevato. La Tabella 3 sintetizza i risultati dell'IHC nel contesto di ciascuna lesione polmonare osservata nei casi in esame.

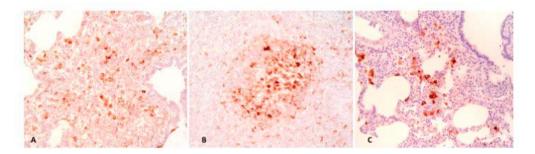


Figura 2. Prova immunoistochimica per PCV2 e PRRSV. A) polmone, macrofagi dell'interstizio positivi per PCV2, caso 26766, 250×; B) linfonodo inguinale superficiale, positività centrofollicolare per PCV2, caso 26767, 250×; C) Macrofagi alveolari e pneumociti di tipo II positivi per PRRSV, caso 26768, 250×; C)

Figure 2. PCV2 and PRRSV immunohistochemistry. A) lung, PCV2+ interstitial macrophages, case 26766, $250\times$; B) inguinal superficial lymph node, centrofollicular positivity to PCV2 antigen, case 26767, $250\times$; PRRSV+ alveolar macrophages and PRRSV+ pneumocytes type II, case 26768, $250\times$.

Tabella 3. Sintesi dei risultati delle prove immunoistochimiche per PCV2 e PRRSV nel contesto delle lesioni polmonari osservate. *BP, broncopolmonite; IP, polmonite interstiziale; PNP, polmonite proliferativa e necrotizzante; CE, congestione ed emorragia; FPP, pleuropolmonite fibrinosa.

Table 3. Summary of results of PCV2 and PRRSV immunohistochemistry associated with the pulmonary lesions. *BP, bronchopneumonia; IP, interstitial pneumonia; PNP, proliferative and necrotizing pneumonia; CE, congestion and hemorrhage; FPP, fibrinous pleuropneumonia.

Lesione anatomopatologica*	N°casi	IHC PCV2+	IHC PRRSV+	IHC PCV2+ / PRRSV+
BP	1	1	2	1
BP + IP	17	6	3	0
BP + IP + PNP	2	0	2	0
BP + IP + FPP	1	1	0	0
IP	44	28	17	11
СЕ	2	1	0	0
FPP	2	1	1	1
PNP	8	5	6	3

Nei 10 casi con lesioni polmonari ascrivibili a PNP, 5 sono risultati PCV2- / PRRSV+; 2 PCV2+ / PRRSV- e 3 PCV2+ / PRRSV+

Nei 44 soggetti con tessuti linfoidi positivi all'IHC per PCV2, 28 (63,6%) mostravano lesioni ascrivibili a deplezione linfocitaria (Figura 3A) e/o flogosi granulomatosa (figura 3B) in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati e positività immunoistochimica per PCV2 in almeno uno dei tessuti linfoidi saggiati con IHC. Questi casi sono stati considerati come PCV2-SD. Nei 16 (36%) casi rimanenti, oltre alle lesioni polmonari positive per PCV2 (riscontrate in 13 su 16), si evidenziava un quadro di lieve/moderata iperplasia del tessuto linfoide o tessuti linfoidi normotrofici, associato o meno a lieve positività a PCV2 nelle cellule dendritiche centrofollicolari in almeno una delle stazioni linfoidi. Questi casi sono stati considerati come PRDC/PCV2+.

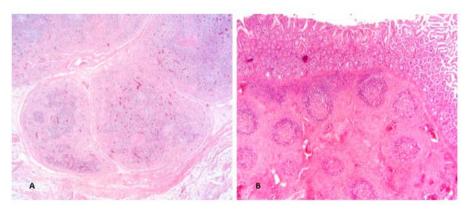


Figura 3. Lesioni nei tessuti linfoidi. A) Linfonodo, deplezione linfoide, caso 26105, 250×; B) Ileo, ileite granulomatosa: granulomi centrofollicolari, caso 26105, 250×. **Figure 3.** Lymphoid lesions. A) lymph node, lymphoid depletion, case 26105, 250x; B) ileum, granulomatous ileitis: centrofollicular granulomas, case 26105, 250×.

Poiché la corretta diagnosi di PCVD deve prevedere che l'iter diagnostico venga condotto su un gruppo di 3-5 soggetti, i risultati relativi alla classificazione e definizione dei singoli casi in PCV2-SD e PRDC/PCV2+ sono stati elaborati anche suddividendoli per azienda di provenienza (Figura 4).

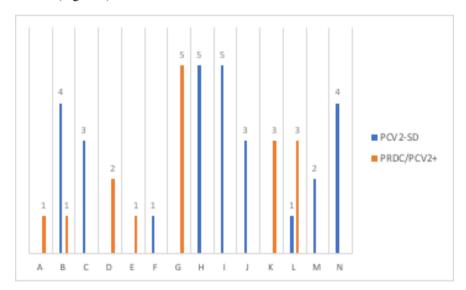


Figura 4. Categorizzazione dei singoli casi PCV2+ suddivisi per azienda di provenienza. A-N azienda di provenienza. In ogni azienda è indicato il numero di soggetti conferiti per l'iter diagnostico, categorizzati, in base ai risultati già riferiti, come portatori di PCVD-SD o di PRDC-PCV2+. Poiché la diagnosi finale è sul gruppo, nelle aziende B ed L la diagnosi finale sarà di PCVD-SD. Si rimanda alla discussione per maggiori dettagli.

Figure 4. Number of PCVD-SD or PRDC-SD cases in each farm. A-N farms. As the final diagnosis is on the flock, in herds B and L the final diagnosis will be PCVD-SD. Refer to the discussion for more details.

Dodici dei 28 casi riconducibili a PCV2-SD (42,9%) sono risultati positivi anche all'IHC per PRRSV nel polmone. Nel 25% dei casi classificati come PRDC/PCV2+ è stata osservata una positività all'IHC per PRRSV (Figura 5).

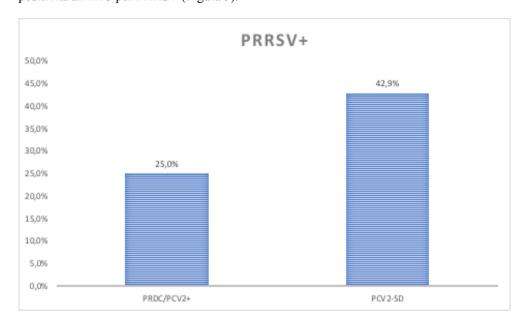


Figura 5. Valori percentuali di positività al PRRSV nel polmone nei casi di PCV2-SD e PRDC/PCV2. *Figure 5.* Percentage values of PRRSV positivity in lung in PCV2-SD and PRDC/PCV2 cases.

DISCUSSIONE

La PRDC è una condizione clinica ad elevata morbilità che si manifesta in suini di oltre quattro settimane d'età con sintomatologia respiratoria spesso non responsiva agli antibiotici e che sottende un ampio spettro di lesioni polmonari causate da microrganismi batterici e virali che agiscono in sinergia nel determinare e/o aggravare il danno polmonare.

In questo studio, condotto utilizzando tecniche istologiche, su 79 casi di PRDC, il *pattern* microscopico di polmonite maggiormente osservato è stata la polmonite interstiziale (55,7%), seguita da forme miste in cui, accanto alla lesione di polmonite interstiziale, si osservavano aree di broncopolmonite essudativa (21,5%).

Nel suino il *pattern* interstiziale di polmonite è quello tipicamente correlato ad infezioni virali che raggiungono il polmone per via ematogena (es. PCV2, PRRSV), mentre l'essudazione di neutrofili e macrofagi nel comparto bronchiolo-alveolare è indice di complicazioni batteriche (Sarli et al., 2021). Le lesioni microscopiche polmonari osservate suggeriscono quindi un quadro dovuto principalmente a infezioni virali complicate da infezioni batteriche secondarie e compatibile, quindi, con la definizione di PRDC (Loosli, 1968; Opriessnig et al., 2011).

I risultati dell'IHC per PCV2 e PRRSV hanno confermato l'associazione dell'aspetto microscopico delle lesioni con la causa virale, rilevando la presenza degli antigeni dei due virus nella maggior parte dei casi in esame associati alla polmonite interstiziale (Tabella 3). Sebbene si tratti di patogeni non esclusivamente respiratori, PCV2 e PRRSV si confermano quali virus fortemente coinvolti in forme cliniche respiratorie del suino (Opriessnig et al., 2011). Nel 20,3% dei casi, l'IHC ha evidenziato la co-infezione PCV2/PRRSV nei polmoni.

La co-infezione tra PCV2 e PRRSV è un fenomeno noto (Burgara-Estrella et al., 2012; Drolet et al., 2003; Fan et al., 2013; Harms et al., 2001; Zeng et al., 2014), così come è noto che l'infezione da PRRSV agisca come co-fattore in grado di aggravare le lesioni ed indurre le manifestazioni cliniche di PCVD (Harms et al., 2001; Park et al., 2014).

In accordo con studi precedenti (Drolet et al., 2003; Morandi et al., 2010), i casi di PNP osservati nel presente lavoro erano associati soprattutto ad infezione con PRRSV e presenza dell'antigene virale nel contesto delle lesioni polmonari, con una rilevante percentuale di casi (30%) positivi sia a PCV2 sia a PRRSV.

In questo studio, pur essendo sempre presente il polmone quale organo target da esaminare, poiché ci si riferiva ad animali con sintomatologia respiratoria, il campionamento ha previsto sempre anche la raccolta di altri organi, rappresentati da tessuti linfoidi, che sono considerati lo standard di riferimento per discriminare tra loro le diverse forme di PCVD. Ciò ha consentito, nei casi in cui è stata rilevata la presenza di PCV2 nel polmone, di pervenire ad una diagnosi di PCV2-SD quando i soggetti presentavano lesioni e positività anche nei tessuti linfoidi. Questo a fronte di una sintomatologia respiratoria comune a tutti i casi esaminati. Infatti, in 28 dei 44 soggetti positivi a PCV2 (63,6%) è stata riscontrata deplezione linfoide in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati (tonsilla, linfonodo tracheobronchiale, linfonodo inguinale superficiale, milza e ileo), in aggiunta alle lesioni polmonari. I criteri diagnostici per la definizione di casi di malattia sistemica da PCV2 stabiliti fin dalle prime descrizioni di malattia associate a PCV2 (Segalés et al., 2005; Segalés, 2012) comprendono la triade composta da segni clinici, lesioni e viral detection nel contesto delle lesioni caratteristiche e sono a tutt'oggi valide (Segalés and Sibila, 2022). Nella casistica esaminata, a fronte di una sintomatologia prevalentemente respiratoria in assenza di grave deperimento ed anemia (segni clinici tipicamente associati alla PCV2-SD), una alta percentuale (63,5%) di casi era in realtà riconducibile a forme sistemiche di malattia da PCV2. Questa osservazione è in accordo con quanto rilevato da Ticó et al., (2013) che non riconosce la "lung disease" come entità a sé stante ma la inquadra come parte di un più ampio quadro sistemico di infezione. L'epidemiologia di PCV2 ha subito modifiche sostanziali dall'avvento della profilassi vaccinale (Segalés, 2015) e negli anni si è assistito ad una riduzione della gravità della malattia, con un aumento della prevalenza dei segni clinici aspecifici nelle categorie produttive colpite (Kristensen et al., 2015). Sebbene i vaccini-PCV2 siano tra i più efficaci impiegati in allevamento, sono comunque descritti casi di PCV2-SD nelle mandrie vaccinate (Opriessnig et al., 2013; Seo et al., 2014). Questo sarebbe principalmente da imputare all'impiego di protocolli vaccinali inappropriati come vaccinazioni tardive o troppo precoci, con interferenza dell'immunità di derivazione materna (Segalés and Sibila, 2022), piuttosto che alla circolazione di nuovi ceppi in grado di evadere la protezione indotta dalla vaccinazione (Sibila et al., 2021). Inoltre bisogna considerare che l'infezione da PCV2 è un fattore necessario ma non sufficiente nel determinismo delle PCVD e che è necessaria la presenza di altri fattori tra cui le co-infezioni batteriche o virali (Segalès et al., 2019).

Il virus della PRRS è individuato come patogeno chiave coinvolto nelle co-infezioni nell'allevamento suinicolo (Saade et al., 2020; Zhao et al., 2021). In questo studio, 12/28 (42,9%) polmoni di soggetti con diagnosi di PCV2-SD erano positivi anche a PRRSV (Figura 7). Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che le co-infezioni PCV2-PRRSV possono indurre segni clinici e lesioni più gravi rispetto alle infezioni sostenute dai singoli patogeni (Allan et al., 2000; Rovira et al., 2002). Le co-infezioni virali possono direttamente o indirettamente determinare una maggiore replicazione e virulenza dei virus coinvolti (Fan et al., 2013; Niederwerder et al., 2015; Niederwerder et al., 2016; Sinha et al., 2011) dovute,

nel caso di PRRSV e PCV2, al sinergismo dei due virus nella modulazione dell'immunità innata e adattativa dell'ospite (Dong et al., 2015; Richmond et al., 2015; Tu et al., 2015). La diagnosi di PCVD è una diagnosi di mandria (Segalés et al., 2019). Considerando la provenienza dei campioni esaminati ed elaborando i dati ottenuti per singola azienda positiva per PCV2 (14/22) (Figura 8), in 7 aziende tutti i suini esaminati presentavano il quadro diagnostico riconducibile e PCV2-SD. In 5 aziende, tutte le forme osservate erano riferibili a PRDC/PCV2+, sebbene da 2 aziende fosse stato conferito solo 1 soggetto e da una solo 2, condizione che potrebbe essere considerata insufficiente per una diagnosi attendibile sulla mandria in funzione dell'eterogeneità fra gli animali. Infatti, in 2 aziende, si è registrata discordanza dei risultati tra i singoli casi esaminati ma, l'evidenza di forma sistemica di malattia su almeno un soggetto tra quelli esaminati depone per la conclusione diagnostica di PCV2-SD sul gruppo.

In questo studio i singoli casi di PRDC diversi da PCV2-SD ma con coinvolgimento di PCV2 (PRDC/PCV2+), erano quelli in cui non si osservavano le lesioni caratteristiche di deplezione linfocitaria nei tessuti linfoidi (16/44, 36,4%). Tuttavia tutti sono risultati positivi a PCV2 a livello polmonare e/o in almeno uno dei distretti linfoidi esaminati, in presenza di lesioni polmonari (fatta eccezione che in tre casi in cui il polmone era negativo a PCV2). Se, in condizioni sperimentali, è raro osservare lesioni polmonari microscopiche con la sola infezione da PCV2 (Hoogland et al., 2006; Opriessnig et al., 2006), in condizioni di campo numerosi co-fattori, infettivi e non, possono concorrere a potenziare il danno polmonare. Alla luce della correlazione positiva tra carica virale PCV2 nel siero e nei tessuti (Grau-Roma et al., 2009) si presume che in soggetti infetti anche in maniera subclinica ed in assenza di deplezione linfoide, il virus partecipi al determinismo della PRDC.

Anche quando non è diagnosticata la forma sistemica di malattia da PCV2 ma si ha l'evidenza di circolazione virale e di presenza dell'antigene nei tessuti, l'infezione ha conseguenze negative sulla sanità della mandria e sulle performances produttive. Nella casistica esaminata, PCV2 è risultato associato in alta percentuale a sintomatologia respiratoria anche in assenza di forma sistemica di malattia. In questi casi, quando è possibile escludere una causa batterica specifica per lo sviluppo di PRDC, l'evidenza di infezione da PCV2 deve costituire un campanello d'allarme per la situazione sanitaria in azienda e guidare il miglioramento delle strategie di controllo e profilassi in allevamento.

CONCLUSIONI

Nei casi di PRDC esaminati in questo studio è stato osservato che PCV2 gioca un ruolo a vario titolo, potendone rilevare la presenza nel polmone in associazione a lesioni microscopiche di polmonite interstiziale. In molti casi, forme cliniche di patologia respiratoria sottendono lesioni non solo polmonari ma anche di deplezione linfoide in diversi distretti linfoidi dell'organismo associate alla presenza di PCV2; questa osservazione permette di indirizzare la diagnosi verso la forma sistemica di PCVD (PCV2-SD). Per evitare di sottostimare il danno indotto da PCV2 è quindi necessario condurre un campionamento appropriato per differenziare la forma sistemica di malattia che, viceversa, in assenza di altri segni tipici, potrebbe non essere correttamente individuata. Sebbene sia superata la definizione di PCV2-LD (Segalés and Sibila, 2022), PCV2 rimane tra i principali patogeni responsabili di PRDC, insieme al PRRSV. In campo le co-infezioni possono aggravare il quando patologico, imponendone il controllo scegliendo le misure più appropriate sulla base delle evidenze patologiche ed analitiche.

BIBLIOGRAFIA

- Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S. (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. Arch. Virol. 145, 2421–2429.
- Burgara-Estrella, A., Montalvo-Corral, M., Bolaños, A., Ramírez-Mendoza, H., Valenzuela, O., Hernández, J. (2012). Naturally co-infected boars with both porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. Transbound. Emerg. Dis. 59, 532–538.
- 3. Caswell, J. L., Williams, K.J. (2015). Respiratory System, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 2, Elsevier. 465-591.
- 4. Chase, C. & Lunney, J. K. (2019). Immune System. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., Diseases of Swine, Wiley, 264–291.
- Christopher-Hennings, J., Erickson, G.A., Hesse, R.A., Nelson, E.A., Rossow, S., Scaria, J., Slavic, D. (2019). Diagnostic Tests, Test Performance, and Considerations for Interpretation. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., Diseases of Swine, Wiley, 75–97.
- Dong, V. H., Tu, P. Y., Tsai, P. C., Lin, Y. H., Chang, H. L., Kuo, T. Y., Chiou, M. T., Lin, C. N., Chung, W. B. (2015). Expression of Toll-like receptor signaling-related genes in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. Res. Vet. Sci. 101, 180–186.
- Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R. (2003). Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. Vet. Pathol. 40, 143– 148
- 8. Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G. M. (2004). Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. Vet. Microbiol. 98, 159-163.
- 9. Fablet, C., Marois-Créhan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N. (2012). Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. Vet. Microbiol. 157, 152–163.
- 10. Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J., Liu, C. (2013). Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. Virol. J. 10, 265.
- 11. Giles, T.A., Belkhiri, A., Barrow, P.A., Foster, N. (2017). Molecular approaches to the diagnosis and monitoring of production diseases in pigs. Res. Vet. Sci. 114, 266–272.
- 12. Grau-Roma, L., & Segalés, J. (2007). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. Vet. Microbiol. 119(2-4), 144–151.
- 13. Grau-Roma, L., Hjulsager, C. K., Sibila, M., Kristensen, C. S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, W., Fraile, L. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. Vet. Microbiol. 135, 272-282.
- 14. Han, K., Seo, H. W., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Kang, S. H., Kim, S. H., Lee, B. H., Kwon, B., Chae, C. (2012). Evaluation of monoclonal antibody-based immunohistochemistry for the detection of European and North American Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and a comparison with in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. 24, 719–724.

- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M., Nielsen, O. L. (2010). An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark, J. Comp. Pathol. 143, 120–131.
- Harms, P. A., Halbur, P. G., Sorden, S. D. (2002). Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. J. Swine Health Prod. 10, 27-30.
- 17. Harms, P. A., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Bolin, S. R., Lager, K. M., Morozov, I., Paul, P. S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Pathol. 38, 528–539.
- Hernandez-Garcia, J., Robben, N., Magnée, D., Eley, T., Dennis, I., Kayes, S.M., Thomson, J.R., Tucker, A.W. (2017). The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. Porc. Health Manag. 3, 7.
- 19. Hoogland, M. J., Opriessnig, T., Halbur, P. G. (2006). Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. J. Swine Health Prod. 14, 133–139.
- Janke, B.H. (1995). Diagnosis of viral respiratory disease in swine. J. Swine Health Prod. 3, 116–120.
- 21. Kim, J., Chung, H. K., Chae, C. (2003). Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. Vet. J. 166, 251–256.
- 22. Kristensen, C. S., Hjulsager, C. K., Larsen, L. E. (2015). A two-year follow-up study of the PCV2 status of a Danish pig herd that was initially assumed to be PCV2-free. Porc. Health Manag. 1, 5.
- 23. Loosli, C.G. (1968). Synergism between respiratory viruses and bacteria. Yale J. Biol. Med. 40, 522–540.
- Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 167, 1–14.
- Lung, O., Ohene-Adjei, S., Buchanan, C., Joseph, T., King, R., Erickson, A., Detmer, S., Ambagala, A. (2017). Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens. Transbound. Emerg. Dis. 64, 834–848.
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. Annu. Rev. Anim. Biosci. 4, 129–154.
- 27. Maes, R.K., Langohr, I.M., Wise, A.G., Smedley, R.C., Thaiwong, T., Kiupel, M. (2014). Beyond H&E. Vet. Pathol. 51, 238–256.
- 28. Meredith i, M. J. (1992). Review of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. Pig Disease And Information Centre.
- 29. Morandi, F., Ostanello, F., Fusaro, L., Bacci, B., Nigrelli, A., Alborali, L., Dottori, M., Vezzoli, F., Barigazzi, G., Fiorentini, L., Sala, V. (2010). Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in italian pigs. J. Comp. Pathol. 142, 74–78.
- 30. Niederwerder, M. C., Bawa, B., Serão, N. V., Trible, B. R., Kerrigan, M. A., Lunney, J. K., Dekkers, J. C., Rowland, R. R. (2015). Vaccination with a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Modified Live Virus Vaccine Followed by Challenge with PRRS Virus and Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Protects against PRRS but Enhances PCV2 Replication and Pathogenesis Compared to Results for Nonvaccinated Cochallenged Controls. Clin. Vaccine Immunol. 22, 1244–1254.
- 31. Niederwerder, M. C., Jaing, C. J., Thissen, J. B., Cino-Ozuna, A. G., McLoughlin, K. S., Rowland, R. R. (2016). Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical

- outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). Vet. Microbiol. 188, 1–11.
- 32. Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. Anim. Health Res. Rev. / Conference of Research Workers in Animal Diseases 12, 133–148.
- 33. Opriessnig, T., Halbur, P. G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. Virus Res. 164, 20–32.
- 34. Opriessnig, T., Halbur, P. G., Yu, S., Thacker, E. L., Fenaux, M., Meng, X. J. (2006). Effects of the timing of the administration of Mycoplasma hyopneumoniae bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. Vet. Rec. 158, 149-154.
- 35. Opriessnig, T., Meng, X. J., Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 591–615.
- 36. Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., Halbur, P. G. (2013). Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. Vet. Microbiol. 163, 177–183.
- 37. Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., Ren, L. (2019). Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. Viruses 11, 185.
- 38. Park, C., Seo, H. W., Park, S. J., Han, K., Chae, C. (2014). Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 95, 2486–2494.
- 39. Paz-Sánchez, Y., Herráez, P., Quesada-Canales, Ó., Poveda, C. G., Díaz-Delgado, J., Quintana-Montesdeoca, M. D. P., Plamenova Stefanova, E., Andrada, M. (2021). Assessment of Lung Disease in Finishing Pigs at Slaughter: Pulmonary Lesions and Implications on Productivity Parameters. Animals 11, 3604.
- 40. Richmond, O., Cecere, T. E., Erdogan, E., Meng, X. J., Piñeyro, P., Subramaniam, S., Todd, S. M., LeRoith, T. (2015). The PD-L1/CD86 ratio is increased in dendritic cells co-infected with porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and the PD-L1/PD-1 axis is associated with anergy, apoptosis, and the induction of regulatory T-cells in porcine lymphocytes. Vet. Microbiol. 180, 223–229.
- 41. Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M. (2002). Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. J. Virol. 76, 3232–3239.
- Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C. A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., Meurens, F. (2020). Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. Vet. Res. 51, 80.
- 43. Sarli, G., D'Annunzio, G., Gobbo, F., Benazzi, C., Ostanello, F. (2021). The role of pathology in the diagnosis of swine respiratory disease. Vet. Sci. 8, 256.
- 44. Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 164, 10–19.
- 45. Segalés J. (2015). Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. Expert Rev. Vaccines 14, 473–487.
- 46. Segalés, J., & Sibila, M. (2022). Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. Vet. Sci. 9, 110.
- 47. Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. Anim. Health Res. Rev. 6, 119-142.

- 48. Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M. (2019). Circoviruses. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., Diseases of Swine, Wiley, 473–487.
- 49. Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M. (2004). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. Vet. Microbiol. 98, 137–149.
- 50. Seo, H. W., Park, C., Kang, I., Choi, K., Jeong, J., Park, S. J., Chae, C. (2014). Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. Arch. Virol. 159, 3107–3111.
- 51. Sibila, M., Rocco, C., Franzo, G., Huerta, E., Domingo, M., Núñez, J. I., Segalés, J. (2021). Genotyping of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) in Vaccinated Pigs Suffering from PCV-2-Systemic Disease between 2009 and 2020 in Spain. Pathogens 10, 1016.
- 52. Sinha, A., Shen, H. G., Schalk, S., Beach, N. M., Huang, Y. W., Meng, X. J., Halbur, P. G., Opriessnig, T. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. Vet. Microbiol. 152, 235–246.
- 53. Sunaga, F., Tsuchiaka, S., Kishimoto, M., Aoki, H., Kakinoki, M., Kure, K., Okumura, H., Okumura, M., Okumura, A., Nagai, M., Omatsu, T., Mizutani, T. (2020). Development of a one-run real-time pcr detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. J. Vet. Med. Sci. 82, 217–223.
- 54. Ticó, G., Segalés, J., Martínez, J. (2013). The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. Vet. Microbiol. 163, 242–247.
- 55. Trang, N.T., Hirai, T., Yamamoto, T., Matsuda, M., Okumura, N., Giang, N.T.H., Lan, N.T., Yamaguchi, R. (2014). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid from naturally infected pigs in a breeding herd. J. Vet. Sci. 15, 361–367.
- 56. Trang, N.T., Ngan, P.H., Hop, N. Van, Hirai, T. (2018). Nasal Swab a New Tool for the Detection of Porcine Respiratory Disease Complex in Natural Infected Pigs. Acta Sci. Microbiol. 1, 2–5.
- 57. Tu, P. Y., Tsai, P. C., Lin, Y. H., Liu, P. C., Chang, H. L., Kuo, T. Y., Chung, W. B. (2015). Expression profile of Toll-like receptor mRNA in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. Res. Vet. Sci. 98, 134–141.
- 58. Valli, V. E. O. (Ted)., Kiupel, M., Bienzle, D., (with Wood, R. D.), (2015). Hematopoietic System, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 3. Elsevier, 102-2068.
- 59. Wellenberg, G. J., Bouwkamp, F. T., Wolf, P. J., Swart, W. A., Mombarg, M. J., & de Gee, A. L. (2010). A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. Vet. Microbiol. 142, 217–224.
- Yaeger, M.J., Alstine, W.G. (2019). Respiratory System. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., Diseases of Swine, Wiley, 393–407.
- 61. Zeng, Z., Liu, Z., Wang, W., Tang, D., Liang, H., Liu, Z. (2014). Establishment and application of a multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of six viruses in swine. J. Virol. Methods 208. 102–106.
- 62. Zhao, D., Yang, B., Yuan, X., Shen, C., Zhang, D., Shi, X., Zhang, T., Cui, H., Yang, J., Chen, X., Hao, Y., Zheng, H., Zhang, K., Liu, X. (2021). Advanced Research in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Co-infection With Other Pathogens in Swine. Front. Vet. Sci. 8, 699561.
- 63. Zimmerman, J. J., Dee, S. A., 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, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., Diseases of Swine, Wiley, 685–708.

CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2: MALATTIA SISTEMICA IN SUINI VACCINATI PER PCV2

TORREGGIANI C.¹, PELLACINI M.², D'ANNUNZIO G.¹, BASSI P.¹, GABBI V.¹, MANFREDI R.¹, PROSPERI A.¹, CHIAPPONI C.¹, LUPPI A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER); ²Ferrero Mangimi:

INTRODUZIONE

Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è il principale agente eziologico di un gruppo di malattie note come malattie associate al circovirus suino (PCVD) che comprendono la malattia sistemica (PCV2-SD), la dermatite e nefrite suina (PDNS), la malattia riproduttiva (PCV2-RD) e infine l'infezione sub-clinica (PCV2-SI) (Segalés, 2012). La PCV2-SD e PCV2-SI sono le condizioni patologiche più importanti dal punto di vista economico (Alarcon et al., 2013). Sebbene la vaccinazione contro il PCV2 abbia drasticamente ridotto l'impatto della PCVD, la diagnosi di PCV2-SD è estremamente importante, soprattutto per essere differenziata da altre cause di deperimento e da forme di PCV2-SI. I criteri diagnostici per PCV2-SD comprendono (Segalés et al., 2005 e Segalés et al., 2022):

- la presenza di segni clinici compatibili con la malattia (ritardo di crescita, deperimento e segni clinici respiratori e/o digestivi);
- l'osservazione di caratteristiche lesioni istologiche nei tessuti linfoidi ed eventualmente in altri tessuti (deplezione linfocitaria, infiltrazione di elementi macrofagico-istiocitari, eventuale presenza di cellule multinucleate e inclusioni anfofile intracitoplasmatiche);
- la dimostrazione della presenza dell'agente eziologico nelle lesioni caratteristiche, attraverso la dimostrazione di quantità da moderate a elevate di antigene di PCV2 nei tessuti linfoidi.

È interessante sottolineare come in uno studio condotto sulla valutazione quantitativa di PCV2 nei tessuti a scopo diagnostico, sono stati proposti come *cut off* per diagnosticare forme di PCV2-SD tramite qPCR, livelli di 10^{6,8-8,4} copie di DNA virale/gr. nei tessuti linfoidi e non linfoidi (Harding et al., 2008).

Attualmente, e sulla base del sequenziamento dell'open reading frame 2 (ORF2), sono stati descritti fino a nove diversi genotipi di PCV2 (Franzo e Ségales, 2018; Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b). Tra questi, PCV2a, PCV2b e PCV2d mostrano una distribuzione globale e sono considerati i più diffusi (Wang et al., 2020b) mentre i restanti sono stati rilevati molto più sporadicamente e in aree molto limitate (Franzo e Segalés, 2018). Nel 1996 il genotipo più frequente nei suini era il PCV2a, ma nel periodo 2000-2004 si è verificato un graduale incremento del genotipo PCV2b, a scapito di PCV2a, a livello globale (Dupont et al., 2008; Carman et al., 2008; Timmusk et al., 2008; Cortey et al., 2009). Questo cambiamento di prevalenza con predominanza del genotipo PCV2b si è verificato quando non era ancora disponibile alcuna vaccinazione contro il PCV2 ed è stato associato a focolai di malattia più gravi. Dal 2010, il PCV2b è stato gradualmente sostituito dal PCV2d (Xiao et al., 2013; Franzo et al., 2016; Tsai et al., 2019). Quest'ultimo genotipo è stato proposto come potenziale causa di "fallimenti vaccinali" (Opriessnig et al., 2013) ma anche suggerito come genotipo con virulenza aumentata (Ssemadaali et al., 2015). Tuttavia, successivi studi sperimentali hanno dimostrato che il PCV2d non sfuggirebbe all'immunità conferita dai vaccini basati sul genotipo PCV2a (Opriessnig et al., 2013; Park et al., 2019), mostrando virulenza sovrapponibile a quella del PCV2a e del PCV2b (Cho et al., 2020).

La vaccinazione di suinetti, scrofette e scrofe contro il PCV2 è una pratica comune in tutto il

mondo. La maggior parte dei vaccini impiegati si basa sul genotipo PCV2a. Questi vaccini possono prevenire la malattia (PCV2-SD) ma non l'infezione (Opriessnig et al., 2020). Tuttavia, casi di PCV2-SD sono occasionalmente diagnosticati negli allevamenti vaccinati e gli interrogativi sulle cause che possono limitare la protezione vaccinale nei confronti di PCV2 sono ancora oggetto di dibattito tra i veterinari del settore.

Il presente lavoro descrive un caso clinico di malattia da PCV2 (PCV2-SD) in un sito 3 di un allevamento multi-sito in provincia di Brescia.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico descritto nel presente lavoro ha interessato un sito 3 appartenente ad un allevamento multi-sito della provincia di Brescia. I capi da ingrasso mediamente presenti nel sito 3 erano 2000, e provenivano dal sito 2, dal quale venivano movimentati a partire da 90 giorni d'età. Dal sito 1, 1500 suini venivano settimanalmente spostati nel sito 2 al peso di circa 7 kg. Il sito 2 conteggiava un totale di circa 9000 capi.

Il piano vaccinale nelle scrofe prevedeva la vaccinazione nei confronti di:

- PRRSV, con vaccino vivo attenuato (MLV), 5 interventi all'anno;
- PCV2, 2 interventi all'anno;
- Influenza suina (sottotipi H1N1, H1N2, H3N2), 2 interventi all'anno;
- rinite atrofica progressiva (RAP), due interventi a 70 e 90 giorni di vita;
- mal rossino e parvovirus, in sala parto.

Nei suinetti in sala parto veniva eseguito vaccino combinato PCV2/Mycoplasma hyopneumoniae intorno al ventesimo giorno di vita.

È interessante sottolineare che gli animali provenienti dal sito 1, ed introdotti nel sito 2, a partire da giugno 2022 non mostravano anticorpi nei confronti del virus della PRRS, a causa di una graduale negativizzazione nei confronti del virus nel sito 1 e questo era confermato dai risultati ottenuti con il continuo monitoraggio su emosieri testicolari e sangue dei suinetti sottoscrofa, rispettivamente con *real time* qPCR e ELISA sierologica (PRRS IDEXX). Questo ha comportato la comparsa di problematiche sanitarie, caratterizzate da viremie da PRRSV e febbre 40-40,5°C, in animali dopo una settimana dall'introduzione nel sito 2, con perdite che si attestavano intorno al 10%, a causa probabilmente di una ri-circolazione virale dai gruppi di suinetti più vecchi a quelli di più recente introduzione, che giungevano nel sito 2 senza una sufficiente protezione anticorpale di derivazione materna.

Gli animali arrivati nel sito 2 a maggio e movimentati a fine luglio nel sito 3, dopo una settimana dall'arrivo mostravano tosse secca, dispnea, formazione di scarti. I suini si mostravano refrattari ai diversi e ripetuti trattamenti eseguiti con l'impiego di florfenicolo (10 mg/kg BW per 5 giorni), doxiciclina (10 mg/kg BW per 5 giorni, nel mangime), trimetoprim (2 mg/kg BW per 5 giorni, nel mangime), lincomicina (10 mg/kg BW per 7 giorni, nel mangime), amoxicillina (20 mg/kg BW per 5 giorni, nel mangime) e paracetamolo (30 mg/kg BW per 5 giorni).

I suini movimentati nel sito 3 a luglio ed inviati al macello tra metà gennaio ed inizio febbraio 2023, hanno evidenziato un'età media al carico di 281 giorni e un incremento ponderale giornaliero (I.P.G.) di 0,770 kg. È stata eseguita inoltre, su una partita di suini macellata a gennaio, la valutazione delle lesioni polmonari al macello (*lung scoring*) applicando la griglia Madec, per la punteggiatura delle lesioni broncopolmonari e SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System) per la valutazione delle pleuriti. In particolare, quest'ultima ha evidenziato un'elevata incidenza di pleuriti croniche sia a localizzazione dorso-caudale sia ventro-craniale.

Indagini di laboratorio

A fine agosto ed inizio settembre 2 suini provenienti dal sito 3, presentanti deperimento e sindrome respiratoria caratterizzata da dispnea e tosse secca, sono stati sottoposti a necrosco-

pia in campo. All'esame anatomopatologico i suini presentavano scadente stato di nutrizione, pelo lungo e linfoadenomegalia dei linfonodi inguinali superficiali. All'apertura della cavità addominale si osservava lieve epatomegalia e splenomegalia, linfoadenomegalia dei linfonodi ischiatici e meseraici. All'apertura della cavità toracica la valutazione dei polmoni evidenziava un quadro macroscopico caratterizzato da edema a livello dell'interstizio polmonare e bronco-polmonite catarrale a livello delle porzioni apicali dei lobi craniali e medi in forma bilaterale, inoltre si evidenziava un quadro di linfoadenomegalia dei linfonodi tracheo-bronchiali. Milza, polmone, linfonodi inguinali, ischiatici, mesenterici e tracheo-bronchiali sono stati prelevati durante la necroscopia e conferiti presso i laboratori IZSLER della sede di Parma per indagini di laboratorio, principalmente volte a confermare il sospetto di PCV2-SD formulato sulla base del quadro clinico osservato e delle lesioni anatomopatologiche descritte.

La milza ed il polmone sono stati sottoposti ad esame batteriologico attraverso metodi routinari e al termine del periodo d'incubazione di 48 ore a 37°C, non è stata rilevata la crescita di agenti patogeni sui terreni colturali impiegati (agar sangue a Gassner agar).

Per ogni suino un *pool* di campioni linfonodali (linfonodi inguinali, ischiatici, mesenterici e tracheo-bronchiali) è stato sottoposto a PCR *real time* quantitativa (qPCR) per PCV2 (Olvera et al, 2004). I *pool* di campioni linfonodali prelevati dal suino n. 1 e n. 2 sono risultati positivi per PCV2, con un numero di copie di DNA virale/gr. pari a 1,4 x 10¹³ e 5,3 x 10¹⁴ rispettivamente. Campioni di milza, linfonodi inguinali, ischiatici, mesenterici e tracheo-bronchiali e di polmone sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina dopo opportuna processazione. Dai tessuti inclusi in paraffina sono state ricavate sezioni di 5 μm di spessore successivamente colorate con Ematossilina-Eosina e valutate al microscopio ottico. Nei diversi campioni linfonodali esaminati i quadri microscopici erano caratterizzati da deplezione linfoide e infiltrazione di cellule macrofagico-istiocitarie con presenza di cellule epitelioidi e giganti multinucleate a localizzazione centro-follicolare (figura 1).

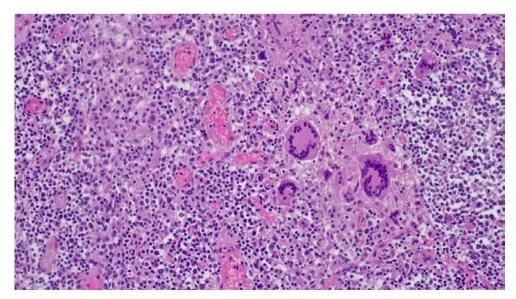


Figura 1. Suino affetto da PCV2-SD. Linfonodo inguinale superficiale con grave deplezione linfoide e scomparsa dei follicoli, rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare e infiltrazione di elementi macrofagico-istiocitari e cellule giganti multinucleate (Ematossilina-Eosina, 40x).

Quadri di deplezione linfoide si osservavano inoltre a livello della milza, mentre il parenchima polmonare mostrava quadri di polmonite interstiziale alveolo-settale con ispessimento dei setti alveolari per infiltrazione di cellule linfocitarie e macrofagiche. Sezioni di 5 um dei diversi distretti linfonodali campionati, della milza e del polmone sono state destinate ad indagine immunoistochimica (IHC) per PCV2. La prova ha previsto l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico (mAb 1A5) prodotto presso il reparto di biotecnologie dell'IZSLER. In sintesi: le sezioni sono state sparaffinate e reidratate; lo smascheramento antigenico è stato eseguito con l'impiego di proteinasi K e incubazione a 37°C. A seguire le sezioni sono state sottoposte a trattamento con protein block (caseina 0.4% in tampone fosfato) seguito da incubazione overnight a 4°C dei preparati con anticorpo primario diluito 1:1000. Le sezioni sono state quindi trattate con il sistema di rilevazione in perossidasi, (anticorpo secondario e complesso streptavidina-biotina-perossidasi; Novolink Detection System Max Polymer, Leica) e la reazione è stata evidenziata utilizzando il cromogeno NovaRED (Vector). Le sezioni sono state contrastate con Ematossilina di Mayer, disidratate e opportunamente montate come da procedura standard. Le diverse sezioni linfonodali mostravano reazione immunoistochimica positiva per PCV2, con positività citoplasmatica nelle cellule macrofagiche e giganti multinucleate (figura 2) per l'antigene di PCV2 nel tessuto linfoide depleto, distribuita a livello centro-follicolare o concentrata in macrofagi nei seni peri-trabecolari.

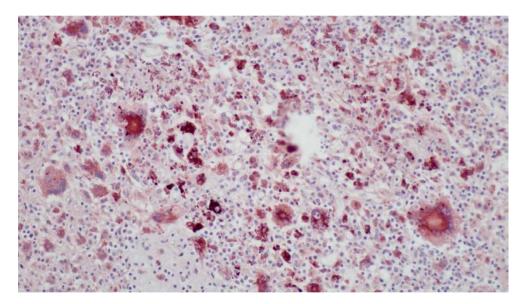


Figura 2. Suino affetto da PCV2-SD. Linfonodo inguinale superficiale. Reazione immunoistochimica per PCV2. Positività citoplasmatica per PCV2, concentrata in macrofagi e cellule giganti multinucleate centro-follicolari, si osserva nel tessuto linfoide depleto, (40x).

Positività immunoistochimica per PCV2 si rilevava a livello splenico nelle cellule macrofagiche e a livello polmonare nel citoplasma dei macrofagi dell'infiltrato infiammatorio peribronchiolare.

I risultati delle indagini di laboratorio, sulla base dei criteri diagnostici aggiornati da Segalés e Sibila (2022), hanno indirizzato la diagnosi verso una forma sistemica di malattia da PCV2 (PCV2-SD).

Successivamente alla conferma della diagnosi di PCV2-SD veniva implementata, in sala parto, in suinetti di 10-15 giorni di vita, la vaccinazione per PRRSV, per prevenire gli effetti negativi legati alla circolazione del virus dopo l'ingresso degli animali nel sito 2, come descritto precedentemente. Contemporaneamente è stato impostato un intervento vaccinale aggiuntivo per PCV2 nel sito 3, in animali di circa 90-110 giorni d'età. Questo ha contribuito, con ogni probabilità, a riportare la situazione sanitaria alle condizioni precedenti il focolaio di PCV2-SD.

DISCUSSIONE

Il caso clinico descritto nel presente lavoro riporta le caratteristiche di un episodio di malattia da PCV2 (PCV2-SD) in un sito 3 di un allevamento multi-sito, in cui veniva praticata la vaccinazione per PCV2 sia nelle scrofe che nei suinetti a 20 giorni d'età. Segalés (2020) riporta che negli ultimi anni è stato notato un aumento di casi di PCV2-SD in allevamenti in cui veniva praticata la vaccinazione. In alcuni casi è possibile ipotizzare che la vaccinazione allo svezzamento non lasci tempo sufficiente all'organismo perché questo possa sviluppare un'adeguata risposta immunitaria vaccinale prima dell'infezione naturale e una percentuale degli animali possa sviluppare PCV2-SD e non solo forme sub-cliniche (PCV2-SI). In questi casi la raccomandazione è di eseguire la vaccinazione nelle scrofe, cercando di ritardare l'infezione naturale da PCV2 o di anticipare la vaccinazione contro il PCV2 (ad esempio a 10-15 giorni di vita) (Segalés, 2020). Quest'ultima opzione dovrebbe essere associata ad una valutazione del livello di anticorpi verso PCV2 negli animali prima di procedere con la vaccinazione. Infatti, una vaccinazione troppo precoce non è priva di rischi, per la potenziale interferenza con l'immunità passiva di origine materna. Per le conoscenze attuali si ritiene che il "fallimento della vaccinazione" sia per lo più associato ad una inadeguata gestione del vaccino (conservazione, dose applicata, ecc.) e al timing della vaccinazione stessa (precoce, con potenziale interferenza con l'immunità di origine materna o tardiva, ad esempio troppo vicina all'infezione naturale) o in corso di concomitanti infezioni da parte di agenti patogeni immunodepressivi, come ad esempio PRRSV. Occorre perciò, prima di tutto, guardare al cosiddetto "fallimento vaccinale" come ad un problema gestionale piuttosto che a un problema di reale inefficacia del vaccino.

L'allevamento oggetto dei casi di PCV2-SD eseguiva la vaccinazione per PCV2 sia nelle scrofe (2 trattamenti all'anno) che nei suinetti (unico trattamento a 20 giorni di vita).

La vaccinazione delle scrofe ha principalmente due obiettivi: prevenire forme di PCVD precoci nei suinetti e prevenire casi di malattia riproduttiva da PCV2 (PCV2-RD). Nel primo caso, la vaccinazione dovrebbe avvenire alla fine della gestazione, mentre se l'obiettivo è prevenire il PCV2-RD, la vaccinazione potrebbe essere applicata prima dell'accoppiamento, nel periodo di allattamento o allo svezzamento per le scrofe di primo parto o più anziane, o durante bacclimatamento nelle scrofette.

La profilassi delle diverse forme di PCVD in allevamento passa, nella maggior parte dei casi, dalla vaccinazione dei suinetti, con effetti benefici più rapidi sulla popolazione, andando ad indurre una risposta immunitaria protettiva nei soggetti a rischio di sviluppare forme di PCVD.

Un'altra opzione è procedere con la vaccinazione sia delle scrofe che dei suinetti. Diversi studi riportano gli effetti benefici di questa pratica sulle *performance* produttive. Questa strategia vaccinale unisce i vantaggi del controllo del PCVD in una modalità di "protezione continua", in grado di proteggere i suinetti dallo sviluppo di PCV-2-SD e migliorare l'esito di PCV2-SI (Segalés, 2020).

In questo scenario, che prevede la doppia vaccinazione (scrofe e suinetti), è importante prendere in considerazione la possibile interferenza dell'immunità di derivazione materna (MDI)

sull'efficacia del vaccino per PCV2 nei suinetti, poiché l'assunzione di colostro da scrofe vaccinate fornisce ai suinetti stessi maggiori quantità di anticorpi nei confronti di PCV2. Tuttavia, è vero che i livelli di anticorpi di origine materna (MDA) devono essere molto elevati al fine di compromettere gli effetti della vaccinazione verso PCV2 nei suinetti, e questo è ovviamente anche legato alla tempistica di vaccinazione in questi ultimi (Segalés, 2020). Un aspetto molto interessante, che merita un breve approfondimento, è la tendenza negli anni alla variazione dei genotipi di PCV2 responsabili di focolai di malattia a livello mondiale. Come già accennato le sequenze del virus a disposizione confermavano una maggiore frequenza di PCV2a durante gli anni '90, di PCV2b durante gli anni 2000 e di PCV2d dal 2010 al 2012 (Sibila et al., 2021). Quest'ultimo genotipo è stato proposto come potenziale causa di fallimenti vaccinali (Opriessnig et al., 2013), ma anche suggerito come genotipo con virulenza aumentata (Ssemadaali et al., 2015). Tuttavia, successivi studi sperimentali hanno dimostrato che PCV2d non sfuggirebbe all'immunità conferita dai vaccini basati sul genotipo PCV2a (Opriessnig et al., 2013; Park et al., 2019), mostrando virulenza sovrapponibile a quella di PCV2a e PCV2b (Cho et al., 2020). Sibila et al. (2021), riporta come i risultati di uno studio spagnolo, condotto su casi di PCV2-SD tra il 2009 e il 2020, che descrive una maggiore frequenza del genotipo PCV2d in animali vaccinati e colpiti da forme di PCV2-SD, rifletta semplicemente la maggiore prevalenza di questo genotipo durante il periodo considerato, piuttosto che un potenziale fallimento del vaccino dovuto alla mancata protezione degli animali nei confronti del genotipo PCV2d.

In conclusione, il presente caso descrive un focolaio di PCV2-SD in un allevamento suino in cui veniva praticata la vaccinazione per PCV2 nelle scrofe (2 trattamenti all'anno) e nei suinetti a 20 giorni di vita. Le informazioni disponibili non permettono di individuare in maniera inequivocabile le cause della scarsa protezione fornita dalla vaccinazione in questo specifico caso, tuttavia è probabile che la condizione osservata sia da imputare a forme di immunodepressione causate dall'infezione da PRRSV, descritta nei suini dopo una settimana dall'arrivo nel sito 2 ossia circa 2 settimane dopo la vaccinazione per PCV2 eseguita nel sito 1 all'età di 20 giorni. Questo potrebbe aver interferito con lo stabilirsi di una solida immunità protettiva vaccinale.

Altro aspetto da considerare, ma che non è possibile confermare con gli elementi a disposizione, è la possibile interferenza dell'immunità colostrale, fornita dalle scrofe vaccinate per PCV2 ai suinetti. Le misure implementate dopo la diagnosi PCV2-SD, caratterizzate dalla vaccinazione per PRRSV nei suinetti in sala parto (10-15 giorni di vita) ed intervento vaccinale aggiuntivo per PCV2 nel sito 3, in animali di circa 90-110 giorni d'età, hanno permesso di riportare le perdite nel sito 3 entro limiti accettabili.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Alarcon P., Rushton J., Wieland B. (2013). Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England—an economic disease model. Prev. Vet. Med. 110, 88–102.
- 2. Carman S., Cai H.Y., Delay J., Youssef S.A., McEwen B.J., Gagnon C.A., Tremblay D., Hazlett M., Lusis J., Fairles J., et al. (2008). The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease 2004–2006. Can. J. Vet. Res. 72, 259–268.
- 3. Cho H., Kang I., Oh T., Yang S., Park K.H., Min K.D., Ham H.J., Chae C. (2020). Comparative study of the virulence of 3 major Korean porcine circovirus type 2 genotypes (a, b, and d) Can. J. Vet. Res. 84, 235–240.
- 4. Cortey M., Pileri E., Sibila M., Pujols J., Balasch M., Plana J., Segales J. (2011). Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV2a to PCV2b in Spain from 1985 to

- 2008. Vet. J. 187, 363-368.
- 5. Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E. (2020). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet. Microbiol. 128, 56–64.
- 6. Franzo G., Cortey M., Segales J., Hughes J., Drigo M. (2016). Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinants forms. Mol. Phylogenet. Evol. 100, 269–280.
- 7. Franzo G., Segales J. (2018). Porcine circovirus 2 (PCV2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. PLoS ONE. 2018;13:e0208585.
- 8. Harding J.C., Baker C.D., Tumber A., McIntosh K.A., Parker S.E., Middleton D.M., Hill J.E., Ellis J.A., Krakowka S. (2008). Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity and nucleocapsid staining intensity. J. Vet. Diagn. Investig. 20, 274–282.
- 9. 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
- Opriessnig T., Karuppannan A.K., Halbur P.G., Calvert J.G., Nitzel G.P., Matzinger S.R., Meng X.J. (2020). Porcine circovirus type 2a or 2b based experimental vaccines provide protection against PCV2d/porcine parvovirus 2 co-challenge. Vaccine. 38, 1975–1981.
- 11. Opriessnig T., Langohr I. (2013). Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. Vet. Pathol. 50, 23–38.
- 12. Park K.H., Oh T., Yang S., Cho H., Kang I., Chae C. (2019). Evaluation of a porcine circovirus type 2a (PCV2a) vaccine efficacy against experimental PCV2a, PCV2b, and PCV2d challenge. Vet. Microbiol. 231, 87–92.
- 13. Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 164, 10–19.
- Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2005). Porcine circovirus diseases. Anim. Health Res. Rev. 6, 119–142.
- 15. Segalés, J. (2020). 'Porcine Circoviruses in 2020: What's new?' In: Stingelin, G.M., Guilherme de Oliveira, L., Montenegro Franceschini V. 'Swine Health and Production: Updating, Innovation and Technology', pp. 4-9.
- 16. Segalés, J., Sibila, M. (2022). Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. Vet Sci. 9, 110.
- Sibila M., Rocco C., Franzo G., Huerta E., Domingo M., Núñez J.I., Segalés J. (2021).
 Genotyping of Porcine Circovirus 2 (PCV2) in Vaccinated Pigs Suffering from PCV2-Systemic Disease between 2009 and 2020 in Spain. Pathogens. 10, 1016.
- 18. Ssemadaali M.A., Ilha M., Ramamoorthy S. (2015). Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. Res. Vet. Sci. 103, 179–186.
- 19. Timmusk S., Wallgren P., Brunborg I.M., Wikstrom F.H., Allan G., Meehan B., McMenamy M., McNeilly F., Fuxler L., Belak K., et al. (2008). Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) Virus Genes. 36, 509–520.
- 20. Tsai G.T., Lin Y.C., Lin W.H., Lin J.H., Chiou M.T., Liu H.F., Lin C.N. (2019). Phylogeographic and genetic characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan from 2001–2017. Sci. Rep. 9, 10782.
- 21. Wang S., Xin C., Wu X., Shi J., Peng Z., Sun P., Wang Y., Xu S., Yang Y., Zhang F. (2020). Genetic characterization of Porcine circovirus type 2 from 2013 to 2018 in Shandong Province, China. Vet. Med. Sci. 6, 76–81.

- 22. Wang Y., Noll L., Lu N., Porter E., Stoy C., Zheng W., Liu X., Peddireddi L., Niederwerder M., Bai J. (2020). Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. Transbound. Emerg. Dis. 67, 1284–1294.
- 23. Xiao C.T., Halbur P.G., Opriessnig T. (2015). Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. J. Gen. Virol. 96, 1830–1841.

UTILIZZO DELL'ANALISI FILOGENETICA DEL GENE ORF5 PER IL MONITORAGGIO DI FILIERA DI CEPPI DI PRRSV-1

USTULIN M.1, TARGHETTA C.1, FERINO L.1, ZANON C.1, ROLLA U.2, VIO D.1

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

² Martini S.p.A, via Emilia 261, Budrio di Longiano (FC)

Parole chiave: PRRS, ORF5, sequenziamento

Keywords: PRRS, ORF5, sequencing

RIASSUNTO

L'analisi delle sequenze dei geni ORF5 e/o ORF7 del virus della PRRS è ormai diventata un'attività routinaria per la sorveglianza epidemiologica dei ceppi circolanti all'interno di un allevamento o di una filiera.

L'elevata disponibilità di sequenze del gene ORF5 depositate in database pubblici, permette il confronto con ceppi di varie provenienze geografiche e di valutare l'evoluzione dei ceppi circolanti in un'ottica internazionale.

Nel presente studio vengono presentati i risultati dell'analisi delle sequenze dei geni ORF5 di PRRS raccolti nel corso di 6 anni nell'ambito della attività di sorveglianza epidemiologica della PRRS in una filiera integrata.

ABSTRACT

Sequencing and analysis of ORF5 and/or ORF7 genes of PRRS virus has become common for epidemiologic surveillance of PRRSV strains circulating among farms.

In recent years, the availability of ORF5 genes published in public database, allows extensive comparison among strains of different geographical origins, and therefore to evaluate viral evolution on an international bases.

Results of the phylogenetic analysis of ORF5 sequences collected during a period of 6 years of PRRS monitoring in a multisite company are described in this study.

INTRODUZIONE

La Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino rappresenta (PRRS), a oggi, una delle patologie a maggior impatto economico nell'allevamento del suino.

La malattia determina, nelle scrofe gravide, la perdita del prodotto del concepimento (aborti, natimortalità, parti prematuri) e, nei soggetti in accrescimento, forme respiratorie, ritardi nella crescita a aumento della mortalità.

Pur essendo disponibili diversi vaccini commerciali, l'elevata variabilità genotipica e fenotipica del virus rendono difficoltosa la gestione della PRRS, rendendo essenziale l'applicazione di adeguate misure di biosicurezza (Corzo et al. 2010).

La malattia è causata da due specie virali, *Betaarterivirus suid* 1e *Betaarterivirus suid* 2, appartenenti al genere *Betaarterivirus*, famiglia Arteriviridae (https://talk.ictvonline.org/taxonomy). I due virus sono storicamente conosciuti rispettivamente come virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino di tipo 1 (PRRSV-1), o ceppo Europeo e virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino di tipo 2 (PRRSV-2), o ceppo Americano. In entrmbi i casi, si tratta di virus a RNA a singolo filamento a senso positivo (ssRNA(+), con un genoma di circa 15 kb, ch include 10 ORF (Firth et al., 2011). La Glicoproteina 5 (GP5), codificata da ORF5, è una delle più utilizzate per studi di epidemiologia molecolare (Franzo et al., 2015).

L'elevata disponibilità di sequenze del gene ORF5 e l'analisi filogenetica delle stesse, ha permesso di evidenziare una notevole variabilità elevata all'interno del PRRSV-1. Attualmente sono riconosciuti quattro Sottotipi (Stadejek et al., 2002, 2006, 2008), il Sottotipo 1, a cui appartiene il ceppo prototipo del PRRSV-1 (ceppo Lelystad), circola in Europa Occidentale mentre in Europa Orientale (ex blocco Sovietico) dominano i Sottotipi 2, 3 e 4 con rari riscontri del Sottotipo 1 (Stadejek et al., 2013).

I dati filogenetici riguardanti il Sottotipo 1 mostrano inoltre una suddivisione in *clades* correlati alla provenienza geografica dei ceppi (Shi et al. 2010), ovvero con ceppi originari dello stesso Paese che si raccolgono nello stesso *clade*.

L'analisi filogenetica permette di monitorare la variabilità dei ceppi circolanti in allevamento e di verificare l'eventuale introduzione di nuovi ceppi, permettendo quindi di verificare se un episodio clinico è legato alla ricircolazione di un ceppo già presente in azienda o all'introduzione di un nuovo ceppo.

Nel seguente studio sono state sottoposte ad analisi filogenetica sequenze ORF5 raccolte in corso di attività di monitoraggio di allevamenti appartenenti ad una filiera integrata.

MATERIALI E METODI

Le sequenze incluse nella presente elaborazione derivano dall'attività di monitoraggio dei ceppi di PRRS circolanti all'interno di una filiera integrata.

L'organizzazione degli spostamenti degli animali prevede l'introduzione di scrofette di 30 kg in strutture dove vengono vaccinate per PRRS all'arrivo, con richiamo ogni tre mesi. Le scrofette fecondate vengono poi trasferite alla scrofaia di destinazione per entrare in produzione. I suinetti, al momento dello svezzamento vengono trasferiti a uno o più siti due e successivamente a siti 3 per l'ingrasso.

La filiera include 14 scrofaie, da sette delle quali provengono 68 delle sequenze incluse in questa analisi. La restanti sequenze provengono da svezzamenti e ingrassi.

Sono stati inclusi nella presente analisi filogenetica 116 sequenze di ORF5 del virus PRRS-1 raccolte nel corso dell'attività di monitoraggio tra il 2017 e il 2022. Sono state inoltre incluse le sequenze depositate delle ORF5 dei ceppi vaccinali e 134 sequenze depositate in Genbank selezionate in modo da essere rappresentative dei diversi Sottotipi di PRRS-1 e di varie aree geografiche. Sono state incluse solo sequenze complete dell'ORF5. Sono state invece escluse sequenze di scarsa qualità, ad esempio troppo corte o con molte basi degenerate, e sequenze riferibili ai ceppi vaccinali (cut off percentuale di identità = 97%).

La sequenza ORF5 del ceppo prototipo di PRRSV-2, il VR-2332, è stato utilizzato come outgroup.

Le sequenze sono state allineate tramite MAFFT. L'albero filogenetico è stato elaborato con il metodo della massima verosimiglianza utilizzando il programma IQ-TREE versione 1.6.12. La visualizzazione dell'albero è stata eseguita con il programma FigTree v1.4.4.

RISULTATI

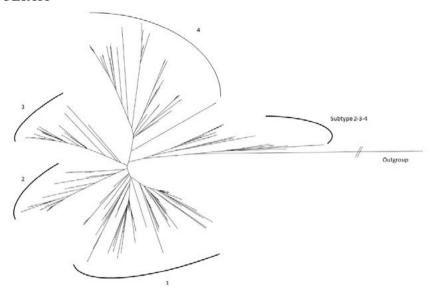


Fig.1: Albero filogenetico *Fig.1*: Phylogenetic tree

L'albero filogenetico così ottenuto (Fig. 1) permette di evidenziare che le sequenze incluse nell'analisi si distribuiscono tra 4 distinti cluster, tutti appartenenti al Sottotipo 1, l'unico circolante in Europa Occidentale (Balka et al., 2018).

Tre sequenze di 2 diverse provenienze clusterizzano con i ceppi vaccinali e il ceppo Lelystad, considerato il ceppo prototipo del PRRSV-1 e a sequenze prevalentemente di provenienza Europea depositate in Genebank tra il 1994 e il 2016.

Le restanti sequenze si suddividono in tre cluster, raggruppandosi assieme a sequenze, prevalentemente di provenienza italiana, ricavate dalle banche dati.

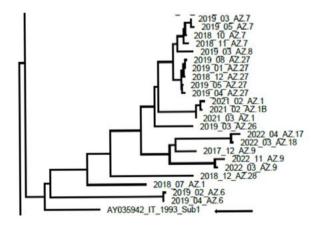


Fig 2: Cluster 2 Scendendo maggiormente nei dettagli, nel cluster 2, assieme a 23 delle sequenze in analisi, è presente una sequenza di provenienza italiana (indicata da una freccia, figura 2).

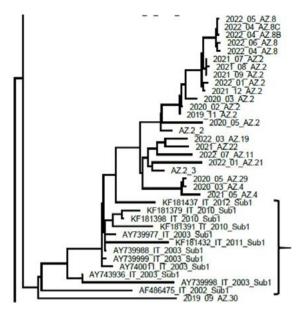


Fig 3. Cluster 3

Nel cluster 3, assieme a 24 delle sequenze in analisi, sono presenti 12 sequenze depositate in GeneBank, provenienti dall'Italia tra il 2002 e il 2012 (indicate dalla graffa in figura 3).

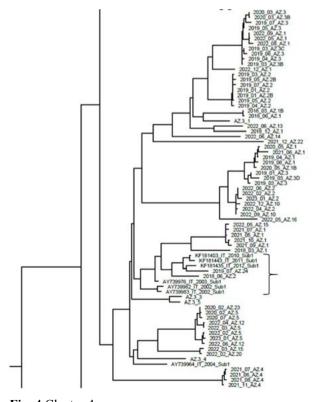


Fig. 4 Cluster 4

Nel cluster 4, assieme a 64 delle sequenze in analisi, sono presenti 8 sequenze depositate in GeneBank, provenienti dall'Italia tra il 2002 e il 2012 (indicate dalla graffa in figura 4).

DISCUSSIONE

L'analisi delle sequenze ha permesso di evidenziare, in linea generale, una buona suddivisione in diversi sotto-cluster dei ceppi circolanti nelle differenti scrofaie; tuttavia, in alcuni casi si osservano, nel corso degli anni, occasionali incursioni di ceppi che mostrano elevata similarità con quelli circolanti in altri allevamenti della filiera.

Queste osservazioni sono importanti ai fini di indirizzare verso indagini retrospettive che permettano di evidenziare eventuali punti critici della biosicurezza (es. personale, attrezzature) e quindi possibili fattori di rischio su cui intervenire.

È interessante osservare che la maggior parte dei ceppi analizzati presenta correlazione con ceppi appartenenti a quello che Balka et al. (2018) definiscono *lineage 3* del Sottotipo 1. Balka suggerisce che questa linea di PRRSV-1 sia comparsa in Italia negli anni '90, abbia circolato in Repubblica Ceca (1995), in Polonia (1996), Spagna (2003), Belgio (2006) per poi diffondersi in Europa Orientale e in Asia (Cina, 2011). Tuttavia, dopo il 2006, l'unico Paese dell'Europa Occidentale hanno continuato a circolare ceppi di PRRS appartenenti a questo *lineage* è l'Italia. I risultati di questo studio confermano quanto evidenziato da Balka mostrando una netta preponderanza del *lineage* 3.

La maggior parte delle sequenze raccolte si raggruppano quindi nel cluster numero 4 (fig.4). E' interessante però il caso della scrofaia n. 2 dove vi è evidenza di co-circolazione di ceppi appartenenti al cluster 3 e 4, e della scrofaia 1 caratterizzata da un'occasionale rilevazione di ceppi appartenenti al cluster 2, oltre a quelli relativi al cluster 4. Questo suggerisce che, in entrambi gli allevamenti, si siano verificate più introduzioni di ceppi di PRRS nel tempo, e che tali ceppi tendono ad essere presenti contemporaneamente nella scrofaia 2, e con discontinuità nella scrofaia 1, dove il ceppo appartenente al cluster 2 sembra non circolare più.

La presenza, all'interno di uno svezzamento, di due sequenze che, pur presentando una similarità inferiore al 97% con i ceppi vaccinali, si localizzano in un cluster che comprende i ceppi vaccinali e il ceppo Lelystad indica, anche in Italia, un'occasionale circolazione di ceppi con caratteristiche simili al ceppo prototipo.

CONCLUSIONI

L'analisi filogenetica, associata a dati geografici e a informazioni relative alle mpovimentazioni degli di animali, rappresenta un importante strumento epidemiologico per monitorare la variabilità e studiare l'evoluzione dei ceppi virali circolanti in un'azienda, una filiera o un'area geografica. Questi dati oltre ad avere valenza epidemiologica, hanno un'utilità pratica andando ad evidenziare eventuali criticità della biosicurezza, che qualora correttamente identificate, permetteno l'adozione di misure correttive.

È importante tenere in considerazione che queste elaborazioni si basano su stime e informazioni incomplete, non vi è infatti, nella pratica, possibilità di identificare ogni singola variazione del o dei ceppi virali circolanti, considerato l'elevato tasso di mutazione del virus. Si sottolinea inoltre il limite dell'utilizzo della sola ORF5 ai fini dell'analisi filogenetica, in quanto essa rappresenta solo una piccola porzione del genoma di PRRSV-1. La disponibilità, in futuro, di un protocollo NGS ottimizzato e standardizzato potrà consentire di ottenere ed analizzare la sequenza completa del genoma di PRRS-1 e permetterà di costruire alberi filogenetici molto più affidabili e informativi.

BIBLIOGRAFIA

- Balka G, Podgórska K, Brar MS, Bálint Á, Cadar D, Celer V, Dénes L, Dirbakova Z, Jedryczko A, Márton L, Novosel D, Petrović T, Sirakov I, Szalay D, Toplak I, Leung FC, Stadejek T. Genetic diversity of PRRSV 1 in Central Eastern Europe in 1994-2014: origin and evolution of the virus in the region. Sci Rep. 2018 May 17;8(1):7811. doi: 10.1038/s41598-018-26036-w. PMID: 29773820; PMCID: PMC5958080.
- 2. Corzo, C.A.; Mondaca, E.; Wayne, S.; Torremorell, M.; Dee, S.; Davies, P.; Morrison, R.B. Control and Elimination of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Virus Res. 2010, 154, 185–192.
- 3. Firth, A. E. et al. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. J. Gen. Virol. 92, 1097–1106 (2011).
- 4. Franzo, G.; Dotto, G.; Cecchinato, M.; Pasotto, D.; Martini, M.; Drigo, M.; Franzo, G. Phylodynamic Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Italy: Action of Selective Pressures and Interactions between Different Clades. Infect. Genet. Evol. 2015, 31, 149–157.
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. (2020) IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. Mol. Biol. Evol., 37:1530-1534. https://doi.org/10.1093/ molbey/msaa015
- 6. Shi, M.; Lam, T.T.Y.; Hon, C.C.; Hui, R.K.H.; Faaberg, K.S.; Wennblom, T.; Murtaugh, M.P.; Stadejek, T.; Leung, F.C.C. Molecular Epidemiology of PRRSV: A Phylogenetic Perspective. Virus Res. 2010, 154, 7–17.
- 7. Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M.B., Belak, S., Drew, T.W., Pejsak, Z., 2002. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. J. Gen. Virol. 83, 1861–1873.
- 8. Stadejek, T. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. J. Gen. Virol. 87, 1835–1841 (2006).
- Stadejek, T.; Oleksiewicz, M.B.; Scherbakov, A.V.; Timina, A.M.; Krabbe, J.S.; Chabros, K.; Potapchuk, D. Definition of Subtypes in the European Genotype of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Nucleocapsid Characteristics and Geographical Distribution in Europe. Arch. Virol. 2008, 153, 1479–1488.
- 10. Stadejek, T.; Stankevicius, A.; Murtaugh, M.P.; Oleksiewicz, M.B. Molecular Evolution of PRRSV in Europe: Current State of Play. Vet. Microbiol. 2013, 165, 21–28.

GRAVE SINTOMATOLOGIA NEUROLOGICA CON ELEVATA MORTALITÀ IN SUINI NEONATI

SEVERE NEUROLOGICAL SYMPTOMS ASSOCIATED TO HIGH MORTALITY IN NEWBORN PIGLETS

MAZZONI C.¹, SCOLLO A.², UBEZIO A.³, D'ANNUNZIO G.⁴, LUPPI A.⁴

¹DVM, PhD Suivet sas, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia; ²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO); ³Dott.ssa Agronoma, 27029 Vigevano (PV);

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Parma (PR)

INTRODUZIONE

Lo scopo del report è quello di descrivere un grave episodio di ipoglicemia neonatale, caratterizzato da sintomatologia neurologica (encefalopatia ipoglicemica) ed evidenziare l'importanza di un corretto percorso diagnostico in grado di discriminare correttamente tra le possibili diagnosi differenziali considerate.

L'ipoglicemia è una frequente causa di mortalità neonatale, ed è un problema abbastanza comune nei suinetti neonati, soprattutto nei più deboli che hanno considerevoli difficoltà ad alimentarsi regolarmente dalla scrofa o anche in suinetti normoergici se l'allattamento è affidato a scrofe con ghiandole mammarie non correttamente funzionanti (Madson et al., 2019).

Il suinetto nasce con bassi livelli di glucosio circolante, basse riserve di glicogeno epatico, niente grasso bruno e per mantenere i livelli di glucosio ematico costanti, deve avere accesso alla poppata almeno una volta all'ora (Done et al., 2012).

Le cause di ipoglicemia nel suinetto neonato sono molteplici e le principali includono fattori legati alla scrofa come la nutrizione, patologie intercorrenti e una riduzione della disponibilità di accesso alle ghiandole mammarie (Madson et al., 2019). Classici esempi sono una ridotta capacità di presentazione di entrambe le file di mammelle da parte della scrofa o alterazioni morfologiche delle stesse, ed in particolare del capezzolo, in grado di comprometterne la funzionalità. Anche la presenza di un maggior numero di suinetti rispetto alle mammelle funzionanti rappresenta un fattore fortemente condizionante l'insorgenza della ipoglicemia, così come un cattivo disegno della gabbia parto oppure condizioni ambientali di eccessiva umidità o freddo che possono contribuire a limitare l'accesso dei suinetti alla mammella con conseguente ulteriore dispersione termica del suinetto ed inevitabile ipoglicemia.

I primi segni clinici di ipoglicemia includono tachicardia, tremore, nervosismo, vocalizzazione, e irritabilità. Con il progredire della condizione sopraggiungono ipotermia, disturbi visivi, ottundimento del sensorio, confusione che sfociano in convulsioni (Madson et al., 2019) vocalizzazioni, schiuma alla bocca (Done et al., 2012), occhio infossato e opistotono, quindi coma e morte (Muirhead and Alexander, 2013).

Solitamente l'ipoglicemia si manifesta fra le 12 e le 24 ore dal parto ed il quadro clinico è caratterizzato dai sintomi sopra descritti. Differenziare la presenza di nistagmo, per escludere altre forme neurologiche, può essere importante (Muirhead and Alexander, 2013), ma i sintomi sono abbastanza caratteristici.

Il trattamento deve avvenire nel più breve tempo possibile per essere di successo, e prevede che il suinetto venga trasferito in un ambiente asciutto, privo di correnti d'aria e ad una temperatura di 30°C (ottima soluzione è una nursery con lampada dedicata). Inoltre, alimentare il suinetto con colostro appositamente munto o derivati commerciali dello stesso (anche una

soluzione calda a base di destrosio al 20%) ogni 20 minuti fino al ripristino della stazione quadrupedale. Una volta recuperato il suinetto, meglio sarebbe darlo in adozione ad una scrofa dedicata (Muirhead and Alexander, 2013). Se l'intervento risulta tempestivo, quindi non sono sopraggiunte complicanze neurologiche di rilevo, la prognosi risulta favorevole.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso descritto ha avuto luogo presso un ciclo chiuso di 280 scrofe di genetica Nero della Lomellina nella provincia di Pavia, gestito in banda trisettimanale con lattazione a 28 giorni e 7 bande. Tutto l'indotto aziendale è indirizzato a prodotti di filiera e, per consentire la massima espressione organolettica del prodotto finale, la rimonta risulta essere rigorosamente interna e gestita attraverso un nucleo di scrofe GP di selezione accoppiate con verri GP sempre di selezione aziendale. Il tutto permette la realizzazione di prodotti di nicchia, piuttosto ricercati dal mercato, dalle caratteristiche certamente uniche.

A livello strutturale, l'azienda si presenta datata, ma la notevole vivacità tecnica del personale aziendale, costituita da due unità della proprietà e due dipendenti esterni, ha permesso l'implementazione di soluzioni ingegnose ed alquanto efficaci in grado di compensare, almeno in parte, le difficoltà strutturali. Il management risulta di tipo convenzionale con le scrofe e le scrofette che compiono un percorso circolare fra gabbie gestazione, boxes gestazione e gabbie parto nel pieno rispetto della normativa vigente in tema di benessere. Le scrofette da autorimonta, vengono recuperate dal flusso dei lattoni aziendale ad un'età di circa 15 settimane, e direttamente accasate all'interno di un settore dedicato della gestazione delle scrofe, per rimanervi fino al peso di coperture di circa 150 kg a circa 8 mesi di età.

L'alimentazione delle scrofe in gabbia gestazione e sala parto è rigorosamente manuale a secco, mentre per le scrofe in *box* è in automatico liquida. Tutto il mangime è acquistato finito dall'industria ed è costituito da un mangime gestazione da 2830 kcal/kg di energia digeribile che viene somministrato dal momento dello svezzamento fino al giorno successivo al parto ed un mangime lattazione da 3200 kcal/kg di energia digeribile che viene somministrato dal secondo giorno dopo il parto, sino al giorno dello svezzamento. Le curve di ingestione teoriche sono riportate in figura 1. Il parto delle scrofe era indotto.

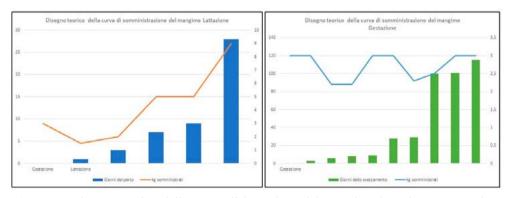


Figura 1. Disegno teorico delle curve di ingestione del mangime lattazione e gestazione durante il periodo del caso clinico.

Figure 1. Theoretical lactation and gestation feed intake curves during the period of the clinical case.

A partire dal gennaio del 2021 si è assistito ad un progressivo incremento della mortalità fra i suinetti neonati che, in un periodo variabile fra i dieci e i trenta minuti dopo il

parto, giungevano a morte con una sintomatologia neurologica piuttosto conclamata contraddistinta da difficoltà al mantenimento della stazione quadrupedale, disorientamento, scialorrea e vocalizzazioni. Durante l'estate dello stesso anno il fenomeno si era ridimensionato sensibilmente per riprendere vigore dal mese di settembre, con mortalità piuttosto elevata (media 23,5 %).

A gennaio 2022 sono stati conferiti presso i laboratori della sede di Parma 13 suinetti neonati, deceduti con i quadri clinici soprariportati, con specifica indicazione di procedere alla conferma o esclusione di encefalomiocardite. La richiesta era generata da precedente risultato di positività in PCR per encefalomiocardiovirus (EMCV), ottenuta da campioni di miocardio prelevati in 4 suinetti deceduti ai primi di ottobre. Alla necroscopia non si evidenziavano lesioni a carico di organi e apparati e si registrava in tutti i soggetti stomaco vuoto. Le indagini batteriologiche eseguite su milza, rene, fegato e cervello, attraverso metodi routinari, al termine del periodo d'incubazione di 48 ore a 37°C, non hanno evidenziato la crescita di agenti patogeni sui terreni colturali impiegati (agar sangue a Gassner agar). Campioni di tessuto miocardico prelevato da ognuno dei 13 suinetti (organizzati in 5 pool) sono stati sottoposti alla ricerca di EMCV tramite rt-PCR [Bakkali Kassimi et al., 2002]. Tutti i campioni sono risultati negativi.

Campioni di milza, polmone, fegato, cuore, cervello, cervelletto e muscolo scheletrico sono stati campionati in 3 animali, fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina dopo opportuna processazione. Dai tessuti inclusi in paraffina sono state ricavate sezioni di 5 µm di spessore successivamente colorate con Ematossilina-Eosina e valutate al microscopio ottico. Le sezioni istologiche di fegato mostravano architettura mantenuta ma evidenziavano, con distribuzione panlobulare (Figura 2), rarefazione citoplasmatica che, a più forte ingrandimento mostrava epatociti con citoplasma eosinofilo chiaro e nucleo centrale.

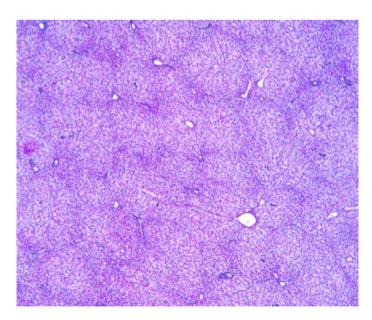


Figura 2. Fegato suino. Rarefazione citoplasmatica degli epatociti a distribuzione panlobulare (Ematossilina-Eosina, 6,3x).

Figure 2. Swine liver. Cytoplasmic rarefaction of hepatocytes with panlobular distribution (Ematossilina-Eosina, 6,3x).

La colorazione istochimica con Acido Periodico di Shiff (PAS) ha evidenziato una scarsa quantità di glicogeno (granuli citoplasmatici rosso-magenta) nel citoplasma degli epatociti, con distribuzione disomogenea nelle filiere epatiche delle diverse zone dei lobuli epatici (Figura 3).

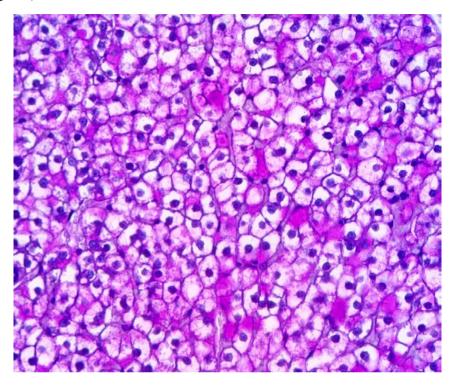


Figura 3. Fegato di suino. Si evidenzia scarsa quantità di glicogeno nel citoplasma degli epatociti (PAS, 40x).

Figure 3. Swine liver. Few glycogens content in the hepatocyte cytoplasm (PAS, 40x).

A carico degli altri tessuti non si evidenziavano lesioni di rilievo, ad eccezione del polmone, dove si osservava scarsa espansione degli spazi aerei polmonari, con iperemia dei capillari presenti a livello dei setti alveolari polmonari.

In seguito alle indagini diagnostiche, ed in particolare per il quadro istologico epatico descritto, il sospetto diagnostico è stato indirizzato verso una forma di ipoglicemia, considerando che quando la glicemia scende al di sotto dei valori normali, in risposta a questa condizione vengono secreti vari ormoni, tra cui il glucagone e l'adrenalina, il cui principale bersaglio è il fegato, dove stimolano enzimi deputati alla degradazione del glicogeno.

Alla luce dell'indirizzo diagnostico formulato, si è optato per procedere ad una supplementazione di zuccheri giornaliera alla scrofa a partire da sette giorni prima del parto e per tutta la durata della lattazione. Il prodotto liquido impiegato, di libera vendita, costituito per il 60% da una miscela di saccarosio, sciroppo di glucosio e destrosio, privo di proteine e grassi, è stato somministrato alle scrofe in ragione di 0.25 l/capo/giorno. Inoltre, si è deciso di implementare un trattamento individuale per suinetti neonati alla comparsa dei primi sintomi di meningite, intervenendo con 4ml/capo.

La prima banda completamente trattata con la supplementazione di zuccheri risale al febbraio

del 2022 e sin da subito aveva dimostrato una completa risoluzione del problema. Per meglio mettere in evidenza i risultati ottenuti dal trattamento proposto, abbiamo raccolto i dati tecnici per singolo parto delle due bande precedenti e delle due bande successive all'inizio della somministrazione del *pool* di zuccheri e i dati riepilogativi sono presentati in tabella 1.

Tabella 1. Riepilogativo dei dati produttivi ricavati nelle due bande precedenti e successivi al trattamento con il pool di zuccheri.

Table 1. Summary of the productive data obtained in the two batches preceding and following the treatment with the sugar pool.

	Gruppo		Gruppo			
	N. di scrofe	Media	Dev. standard	Media	Dev. standard	P-values
Nati vivi, n.	46	10,804	3,462	11,429	2,685	ns
Nati morti, %	46	20,459	17,210	4,157	8,165	<0,0001
Mummificati, %	immificati, % 46		8,539	1,173	3,393	ns
Mortalità con sintomatologia neurologica, %	46	23,549	25,944	0,575	2,938	<0,0001
Suinetti tolti dalla nidiata, %	46	8,065	15,527	17,636	20,459	0,002
Suinetti aggiunti alla nidiata, %	46	22,466	61,142	6,478	12,356	ns
Svezzati, n,	46	8,326	2,088	9,469	1,660	<0,0001
Mortalità per altre cause, %	46	6,141	10,308	2,931	4,622	ns

Dopo il trattamento fatto alle scrofe, solo 51/560 suinetti hanno avuto bisogno di una supplementazione individuale del pool di zuccheri (pari al 9.1%) che ha sortito una rapidissima remissione dei sintomi esitando in nessuna perdita.

I dati raccolti da ogni singolo parto sono stati inseriti in tabelle *Excel*. L'analisi statistica è stata effettuata tramite il programma XLSTAT2022. Le analisi eseguite sono non parametriche utilizzando metodica Kruskal-Wallis.

Dai dati esaminati si evince l'efficacia del trattamento con la significativa riduzione dei morti con sintomatologia neurologica, peraltro ripetuti sulle bande successive sino ai giorni nostri. Quello che però risulta altrettanto interessante è notare come nel gruppo dei trattati, ci sia un significativo effetto positivo sia sulla riduzione dei nati morti e anche sul numero di svezzati. Aumentato invece il numero di suinetti tolti dalla propria nidiata per essere baliati.

DISCUSSIONE

I suinetti neonati hanno limitate capacità di gluconeogenesi, e questo porta ad un elevato rischio di ipoglicemia nel suinetto che non riesce ad alimentarsi correttamente nelle prime 15-20 ore post-parto (Svendsen et al., 1986). Questa ipoglicemia determina una cascata

di eventi che causano disturbi metabolici, sbilanciando la termogenesi e innescando l'acidosi metabolica. In questa situazione, le catecolamine giocano un ruolo principale nel mantenere la temperatura corporea del suinetto nel range della sopravvivenza (Ouisber. 1995), contrastando la perdita di calore che avviene per evaporazione, conduzione, convezione, e radiazione (Cunningham, 1997). Nel presente studio, la somministrazione di soluzione glucosata ha migliorato la mortalità dei suinetti con sintomatologia ascrivibile a ipoglicemia, ed ha migliorato anche la natimortalità. Questo risultato, oltre all'osservazione che l'ipoglicemia sopraggiungeva tra i primi 10-30 minuti post-parto, fa ipotizzare che la problematica non fosse legata all'impossibilità del suinetto di alimentarsi nelle prime ore di vita per cause ambientali o legate alla madre, bensì fosse un'impossibilità dovuta a cause legate al suinetto stesso, probabilmente originate nel peri-parto. Tra le cause di una maggiore predisposizione all'ipoglicemia così precoce, vi è anche la nascita pretermine, oppure l'ipossia durante il parto (Andersen et al., 2016). A seguito di un parto normale, la sopravvivenza dei suinetti neonati dipende quasi esclusivamente dalle loro capacità neurologiche, inclusa la maturità della propriocezione e del controllo muscolare per supportare il movimento, unitamente alle capacità cognitive di sviluppo cerebrale per interfacciarsi con la madre, l'ambiente ed i propri fratelli. I suinetti prematuri manifestano diversi segni clinici che suggeriscono un ritardo di sviluppo e cognitivo, come per esempio gli occhi socchiusi, un ritardo nel raggiungere il nido o la mammella ed un aumenta frequenza di decubito rispetto ai suinetti a termine. Questo può certamente essere correlato all'immaturità neurologica, ma può anche dipendere alle limitate riserve energetiche, con conseguenti ipoglicemia e ridotta cortisolemia, che sono più marcate nel suinetto pretermine. Difficile comprendere se l'ipoglicemia sia una causa o una conseguenza di un parto pretermine, ma certamente va considerata la criticità di collocare correttamente l'induzione al parto per evitare di esacerbare una problematica già frequente nella specie suina (Andersen et al., 2016). In effetti, l'asfissia stessa durante un parto languido può essere una condizione predisponente l'ipoglicemia precocissima del suinetto (Alonso-Spilsbury et al., 2005). In questo senso, la somministrazione di zucchero alla madre può aver avuto effetti benefici anche sulla lunghezza del parto, evitando i casi di esaurimento energetico della madre durante il parto, con conseguenti espulsioni ritardate dei suinetti. Effettivamente, suinetti vigorosi alla nascita riescono ad interfacciarsi e ad interagire molto più efficientemente con l'ambiente subito dopo la nascita, e l'assistenza al parto può essere una delle soluzioni per ridurre il rischio di anossia durante il parto, aumentando le probabilità di sopravvivenza dei suinetti (English, 1988). Probabilmente, l'episodio clinico registrato nel presente caso studio ha anche aumentato l'attenzione del personale della sala parto verso la nidiata e la scrofa partoriente, portando all'aumento dei baliaggi dei suinetti in difficoltà e ad una loro maggiore cura, e al conseguente aumento del numero di svezzati per scrofa.

Nel presente studio vale la pena sottolineare che il ridotto contenuto di glicogeno negli epatociti evidenziato con indagini istopatologiche ha permesso di avanzare il sospetto di una condizione di ipoglicemia, sospetto poi confermato *ex iuvantibus* dalla remissione della sintomatologia. L'istopatologia, disciplina scientifica che, almeno nel nostro paese, viene ancora troppo di frequente trascurata, si rivela strumento diagnostico sempre più spesso di grande utilità nella diagnostica in patologia suina, come peraltro già ben risaputo anche in altre discipline della medicina veterinaria.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. Giuseppe Sarli per il supporto tecnico-scientifico fornito per la parte relativa alle indagini istopatologiche.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Alonso-Spilsbury, M., Mota-Rojas, D., Villanueva-García, D., Martínez-Burnes, J., Orozco, H., Ramírez-Necoechea, R., ... & Trujillo, M. E. (2005). Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review. Animal reproduction science, 90(1-2), 1-30.
- 2. Andersen, A. D., Sangild, P. T., Munch, S. L., van der Beek, E. M., Renes, I. B., Ginneken, C. V., ... & Thymann, T. (2016). Delayed growth, motor function and learning in preterm pigs during early postnatal life. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 310(6), R481-R492.
- 3. Bakkali Kassimi L., Gonzague M., Boutrouille A., Cruciere C. (2002). Detection of Encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and onestep RT-PCR. Journal of Virological Methods 101 (2002) 197–206.
- 4. Cunningham, J.G., 1997. Fisiolog'ia Veterinaria. McGraw-Hill-Interamericana, Mexico, pp. 662, 697–703.
- 5. Done S., Williamson S.M., Strugnell B.W. (2012) "Nervous and Locomotor System" in Zimmermann J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G.W., Zhang J. "Disease of Swine"; Ch.19, 10th edition; John Wiley & Sons, Inc. Published 2012 by John Wiley & Sons, Inc.; pag: 303.
- English P.R. (1988) Reducing piglet losses from management and climatic factors in UK, 10th International Pig Veterinary Society Proceedings, August 14–17, Brazil (1988), p. 336
- Madson D.M., Arruda P.H.E., and Arruda B.L. (2019) "Nervous and Locomotor System" in Zimmermann J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G.W., Zhang J. "Disease of Swine"; Ch.19, 11th edition; John Wiley & Sons, Inc. Published 2019 by John Wiley & Sons, Inc.; pag: 349-350.
- 8. Muirhead R.M., Alexander T.J.L. (2013) "Managing health in the farrowing and suckling period" in Carr J. "Managing pig health"; Ch.8; 2° edition; 5m Publishing, Sheffield UK; pag: 315-316
- 9. Quisber, V.L., 1995. Neonatolog'ia. Interamericana-McGraw-Hill, Mexico.
- 10. Svendsen, J., Svendsen, L.S., Bengtsson, A.C., 1986. Reducing perinatal mortality in pigs. In: Leman, A., et al. (Eds.), Diseases of Swine. Iowa State University Press, pp. 813–825.

SINTOMI NEUROLOGICI IN SUINI POST-SVEZZAMENTO

DE LORENZI G.¹, BARISELLI S.¹, GHERPELLI Y.¹, PUPILLO G.¹, BORRI E.², FRANCHI L.², D'ANNUNZIO G.¹, LUPPI A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), ²Progeo, Reggio Emilia, Italy

INTRODUZIONE

Le malattie del sistema nervoso centrale (SNC) nei suini si osservano di frequente e generalmente sono causate da malattie infettive. La streptococcosi in particolare rappresenta una delle più frequenti cause infettive in questa specie. Tuttavia, le cause che intervengono nel determinare forme neurologiche nel suino possono anche essere di altra natura: genetica, di origine congenita, carenziale o tossica. Generalmente i disturbi neurologici si manifestano con sintomi come atassia, incoordinazione, anormale andatura, paresi, paralisi, tremori, pedalamento, opistotono, convulsioni, nistagmo e morte. La raccolta delle informazioni anamnestiche e la valutazione clinica, solitamente accompagnate da indagine necroscopica ed appropriato campionamento per un'accurata diagnostica differenziale, sono i passaggi necessari per confermare l'eziologia specifica del processo patologico che stiamo osservando. Il campionamento, in particolare, dovrà prevedere la raccolta di campioni da suini nella fase acuta della malattia e non trattati con antibiotici. Tra le diverse indagini di laboratorio necessarie ad indirizzare correttamente la diagnosi, tra cui la batteriologia e le metodiche biomolecolari, è necessario predisporre un adeguato campionamento fissando i tessuti in formalina tamponata al 10%. In caso di sintomatologia nervosa il campionamento per indagini istopatologiche deve includere almeno il cervello, il cervelletto, il tronco encefalico e il midollo spinale. I quadri microscopici nel caso di forme neurologiche hanno grande potere discriminante, essendo in grado d'indirizzare la diagnosi sulla base dei *pattern* infiammatori o particolari aspetti degenerativi.

Scopo del presente lavoro è descrivere un caso clinico caratterizzato dalla comparsa di sintomi neurologici in suini di 35 giorni d'età verificatosi nel sito 2 di un'azienda multisito del nord Italia e di discutere le possibili diagnosi differenziali tenendo in considerazione anamnesi, decorso clinico e i dati di laboratorio. Questi ultimi hanno permesso di ricondurre la causa dell'insorgenza della forma clinica ad un fenomeno tossico, compatibile con intossicazione da cloruro di sodio o condizione di ipernatremia. L'aumento della pressione nelle tubature dell'acqua nei box in cui era comparsa la sintomatologia ha permesso la risoluzione della problematica sanitaria.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico in oggetto ha interessato il sito 2 di una azienda multisito. I suinetti venivano spostati dalla scrofaia (sito 1), con svezzamento a banda settimanale, a 28 giorni di vita e a 7 kg di peso. Il piano vaccinale di scrofe e suinetti è riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Piano vaccinale di scrofe e suinetti

SCROFE						
PRRSV + Parvovirus + E. rhusiopathiae + S. suis (vaccino stabulogeno)						
+ E. coli + Rinite atrofica						
SUINETTI						
PCV2 + Mhyo + L. intracellularis						

A ottobre 2022 nel sito 2 si osservava la comparsa di sintomi neurologici in suini di circa 35 giorni d'età svezzati da una settimana. La prima settimana post-svezzamento i suini erano stati posizionati in box con pavimentazione in plastica. Dopo la prima settimana, per ragioni organizzative dell'azienda, 100 suini erano stati spostati in un altro settore del capannone con pavimentazione in cemento ed erano stati distribuiti in 4 box. Due giorni dopo lo spostamento, il 70% dei suini movimentati presentava sintomi neurologici quali pedalamento, tremori, posizione di "cane seduto", decubito laterale, digrignamento dei denti e *head pressing* in assenza di ipertermia e di altri segni evidenti all'esame clinico. La morbilità era pari al 70%, mentre la mortalità era pari al 4%. Il giorno stesso della comparsa dei sintomi, due suini con sintomi neurologici sono stati eutanizzati e conferiti alla sede territoriale di Reggio Emilia dell'IZSLER per essere sottoposti ad esame necroscopico. In sede di necroscopia in entrambi i soggetti non si osservavano lesioni macroscopiche significative ma lesioni aspecifiche quali: congestione ematica passiva del fegato, stomaco privo di contenuto alimentare, gastrite catarrale e presenza di feci disidratate nel colon in uno dei due soggetti. Nessun'altra lesione macroscopicamente evidente si osservava in altri organi o apparati.

Le diagnosi differenziali prese in considerazione sulla base di anamnesi, segni clinici e lesioni anatomo-patologiche osservate sono riportate in Figura 1, distinte in diagnosi differenziali primariamente da considerare, perché comprendono le malattie che si verificano più di frequente nel post-svezzamento, e secondarie, meno frequenti rispetto alle prime (Rademacher, 2001).

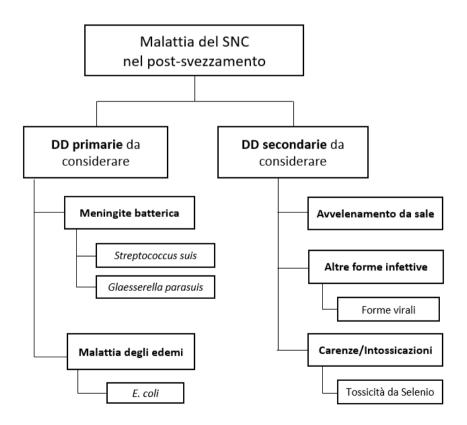


Figura 1. Diagramma di flusso con le diagnosi differenziali, tratto da Rademacher, 2001 (modificato). DD: diagnosi differenziali.

Sulla base delle diagnosi differenziali sopraccitate, in corso di necroscopia sono stati prelevati campioni da destinare ad indagini diagnostiche, come riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Campioni prelevati per indagini diagnostiche, esami di laboratorio effettuate e risultati ottenuti.

Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati	
Esame colturale	Rene, milza	Semina su agar siero e Gassner agar incubati a 37°C per 48 ore in aerobiosi	Negativo per agenti patogeni	
	Encefalo	Semina su agar sangue + NAD incubati per 48 ore in atmosfera al 5-10% di CO ₂	Negativo per agenti patogeni	
	Intestino tenue	Semina su agar sangue incubati per 48 ore in aerobiosi	Negativo per agenti patogeni	
Esame istologico	Polmone, milza, rene, fegato, linfonodo inguinale, cuore, muscolo scheletrico, ileo, encefalo	Valutazione isto- morfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	Encefalo: gliosi, manicotti perivascolari composti da linfociti, plasmacellule e rari granulociti eosinofili. Diffusa spongiosi con vacuolizzazioni e foci di rarefazione della lamina superficiale del parenchima corticale. Assenti altre alterazioni significative in altri parenchimi	

Campioni di polmone, milza, rene, fegato, linfonodo inguinale, cuore, muscolo scheletrico, ileo, encefalo sono stati prelevati durante la necroscopia e l'esame anatomopatologico, fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina dopo opportuna processazione. Sezioni al microtomo di $5~\mu m$ sono state successivamente colorate con Ematossilina-Eosina e valutate al microscopio ottico. Mentre l'esame colturale risultava negativo, i quadri istologici

osservati in entrambi i suini evidenziavano un grave danno cerebrale con diffusa spongiosi e marcata rarefazione del parenchima corticale cerebrale. Diffusamente, in tutto il parenchima esaminato, gli spazi perivascolari erano espansi da elementi infiammatori caratterizzati da granulociti eosinofili, linfociti e plasmacellule presenti in proporzioni diverse a seconda dei diversi campi valutati (Figura 1). I quadri istologici osservati, caratterizzati da grave spongiosi corticale, encefalite eosinofilica e linfoplasmacellulare con *cuffing* perivascolare, unitamente alle informazioni anamnestiche e ai risultati delle altre indagini di laboratorio indirizzavano la diagnosi verso una problematica su base tossica.

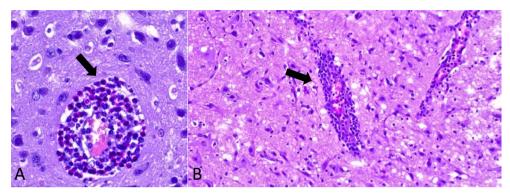


Foto 1. Cervello di suino. Si osservano manicotti perivascolari di granulociti eosinofili ed elementi linfoplasmacellulari (frecce) (ematossilina ed eosina, A: 100x; B: 40x). Alla comparsa dei sintomi, lo spostamento dei suini dai box in cui erano stati collocati e il loro ricollocamento in un'altra area del capannone, ha visto la graduale risoluzione della problematica sanitaria, senza che si presentassero ulteriori casi nel gruppo.

DISCUSSIONE

L'approccio diagnostico alle forme neurologiche comprende la raccolta completa dell'anamnesi, la valutazione clinica e l'esecuzione dell'esame necroscopico. Le diagnosi differenziali indirizzano un appropriato campionamento e la scelta delle analisi di laboratorio da eseguire al fine di confermare l'eziologia del processo patologico osservato (Madson et al., 2019). Il campionamento dell'encefalo nelle forme neurologiche è fondamentale per l'esecuzione dell'esame istopatologico che è considerato uno dei test diagnostici di prima scelta nella diagnosi delle forme neurologiche del suino (Segales et al., 2013).

Nel caso clinico in oggetto la sintomatologia osservata, il decorso e i quadri istopatologici osservati (rarefazione della lamina superficiale del parenchima corticale, spongiosi corticale, encefalite linfoplasmacellulare ed eosinofilica con *cuffing* perivascolare), indirizzavano la diagnosi verso una forma tossica con aspetti morfologici compatibili con intossicazione da cloruro di sodio o avvelenamento da sale.

Nel caso di avvelenamento da sale è caratteristica la presenza di granulociti eosinofili che infiltrano le meningi e gli spazi perivascolari encefalici (Cantile e Youssef, 2016). Nel suino i granulociti eosinofili spesso dominano l'infiltrato perivascolare encefalico, ma questo rappresenta un quadro iniziale e transitorio. Gli eosinofili infatti possono scomparire o essere sostituiti da elementi infiammatori mononucleati (Madson et al., 2019).

Questa condizione potrebbe spiegare la presenza di alcuni quadri aspecifici all'esame istologico e la presenza di un infiltrato linfoplasmacellulare, con prevalenza di eosinofili solamente in alcuni campi.

L'infiltrazione perivascolare di eosinofili è stata descritta anche in corso di microangiopatia

dietetica (*mulberry heart disease*) (Cantile e Youssef, 2016), di encefaliti parassitarie (Prado et al., 2021) e nell'infezione da Teschovirus (Vreman et al., 2020), malattie non compatibili con questo caso clinico.

La diagnosi di avvelenamento da sale viene confermata quando viene riferita privazione di acqua o una eccessiva assunzione di cloruro di sodio. Nel suino più di frequente l'avvelenamento da cloruro di sodio è causato dalla privazione o scarso apporto di acqua piuttosto che dall'aumento di sale nella dieta (Madson et al., 2019).

Nel presente caso clinico, l'anamnesi e il decorso permettevano di escludere una causa infettiva, mentre il quadro istopatologico indirizzava la diagnosi verso una forma tossica compatibile con intossicazione da cloruro di sodio. L'azienda oggetto del caso clinico aveva avuto in passato problemi di bassa pressione nelle tubature dell'acqua. In seguito quindi alla comparsa dei segni clinici si è intervenuti aumentando la pressione nelle tubature dell'acqua nei box in cui era comparsa la problematica sanitaria. L'aumento della pressione dell'acqua nelle tubature ha rapidamente permesso la risoluzione della sintomatologia descritta.

La diagnosi di ipernatremia può essere confermata quando in anamnesi viene riferita la privazione di acqua, informazione che tuttavia non è sempre possibile ottenere. In questo senso quindi appare importante sottolineare come l'impiego di metodiche basate sulla valutazione morfologica delle lesioni, siano di fondamentale importanza per indirizzare la diagnosi verso possibili cause di malattia.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Cantile C., Youssef S. (2016) "Nervous System" in Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Vol. 1. Ed. Maxie MG, 6th ed., 314-315.
- Madson D.M., Arruda P.H.E., Arruda B.L. (2019) "Nervous and Locomotor System" in J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, Ramirez A., K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, J. Zhang, Diseases of Swine. 11th ed., 339-372.
- 3. Prado R.G.S., Gardiner C.H., Moura M.A.O., Gonzalez G.B.E., Duarte M.D., Santos T.F.S., Bezerra P.S., Cerqueira V.D., Amaral A.S., Riet-Correa G. (2021) "Parasitic encephalitis caused by Stephanurus dentatus in a pig in Brazil". J Vet Diagn Invest. 33(5):949-951.
- 4. Rademacher C.J. (2001) "Diagnostic Approaches to Swine Central Nervous System Disorders". J Swine. Health Prod. 9(1):31–33.
- Segalés J., Martínez J., Castellà J., Darwich L., Domingo M., Mateu E., Martin M., Sibilia M. (2013) "Laboratory diagnosis of nervous and locomotor disorders" in Handbook of laboratory diagnosis in swine. Edra. 101
- Vreman S., Caliskan N., Harders .F, Boonstra J., Peperkamp K., Ho C.K.Y., Kuller W., Kortekaas J. (2020) "Two novel porcine teschovirus strains as the causative agents of encephalomyelitis in the Netherlands". BMC Vet Res. 16(1):51.

POSTER

ANTIMICROBICO-SENSIBILITÀ DI CEPPI DI *GLAESSERELLA PARASUIS* ISOLATI DA SUINI COMMERCIALI DAL 2017 AL 2022

ANTIMICROBIAL-SENSITIVITY OF GLAESSERELLA PARASUIS STRAINS ISOLATED FROM COMMERCIAL PIGS FROM 2017 TO 2022

CORDIOLI B., RIZZARDI A., GUOLO A., PALAZZOLO L. GARBUIO M., DRIGO I., VIEL L., BANO L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di batteriologia speciale, sezione di Treviso

Parole chiave: *Glaesserella parasuis*, antimicrobico-sensibilità, MIC *Keywords*: *Glaesserella parasuis*, antimicrobial-susceptibility, MIC

RIASSUNTO

La malattia di Glässer è una patologia a diffusione globale caratterizzata da polisierosite e artrite, sostenuta da Glaesserella Parasuis (GP). Date le limitate informazioni circa la sensibilità agli antimicrobici di questo microrganismo, soprattutto in Italia, con questo studio si è voluta indagare la sensibilità di 30 ceppi isolati da suini sintomatici provenienti da allevamenti veneti nel periodo 2017-2022 per fornire informazioni utili circa l'efficacia in vitro di 9 molecole rappresentative delle più comuni classi di antibiotici utilizzati in suinicoltura. La sensibilità è stata valutata attraverso la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), ottenuta mediante il metodo della microdiluizione in brodo. Ad eccezione dei sulfamidici potenziati (43% di ceppi resistenti) gli isolati sono risultati ampiamente sensibili ad ampicillina, ceftiofur, enrofloxacina, florfenicolo e amoxicillina addizionata con acido clavulanico. Minime resistenze sono state registrate per tetraciclina e tilmicosina, rispettivamente 17 e 14% degli isolati, restando in linea con i profili di antimicrobico-sensibilità di altri paesi europei (Wissing et al., 2001; Aarestrup et al., 2004; Nedbalcova et al., 2006; de la Fuente et al., 2007). La mancanza di Break Point solidi e le molteplici localizzazioni del patogeno complicano l'interpretazione delle MIC, rendendo necessarie future misure profilattiche dirette e indirette alternative alla terapia antibiotica.

ABSTRACT

Glässer's disease is a global disease characterized by polysierositis and arthritis, caused by *Glaesserella Parasuis* (GP).

Since fewer studies were published about the antimicrobic-susceptibility of the pathogen, this study aimed to test the in vitro efficacy of 9 antibiotics used in pig farming on 30 strains isolated from symptomatic swines of Veneto farms between 2017 and 2022. The sensitivity was assessed by determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), obtained by broth-microdilution.

Except for thrimethoprim/sulfametoxazol (43% of resistant strains) the isolates were found to be widely susceptible to ampicillin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol and amoxicillin-clavulate. In accordance with antimicrobial-susceptibility studies of other European countries fewer strains showed resistence to tetracycline (5) and tilmicosin (4) (Wissing *et al.*, 2001; Aarestrup *et al.*, 2004; Nedbalcova *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007). The lack of solid Break Points and the different localizations of the pathogen make the interpretation of the MIC values difficult. In the future it will be necessary to develop adequate direct and indirect prophylactic measures alternative to antibiotic therapy.

INTRODUZIONE

Glaesserella Parasuis (GP) (ex Haemophilus parasuis) è un bacillo Gram negativo NAD-dipendente, appartenente alla famiglia delle Pasteurellacee e agente eziologico della malattia di Glässer. Ad oggi si conoscono 15 serovar (1-15) con caratteristiche di virulenza variabili, ma non si esclude che ne esistano delle altre, tra i numerosi ceppi che in molteplici studi sono risultati non tipizzabili (Luppi et al., 2013; Howell et al., 2015). Il patogeno può essere isolato dalle alte vie respiratorie di soggetti clinicamente sani (ceppi considerati "avirulenti" – serovar 3, 6, 7, 9, 11), ma anche rendersi responsabile di forme sistemiche (serovar 1, 2, 4, 5, 8, 12-15) (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992). Tra le forme cliniche si distinguono quadri iperacuti con morte improvvisa del soggetto in assenza di significative lesioni anatomopatologiche, quadri acuti caratterizzati da polisierositi, poliartriti e meningiti purulente e quadri cronici con fibrosi delle sierose (Aragon et al., 2019). Le forme sistemiche sono spesso sporadiche e risultano epidemiologicamente associate a concomitanti infezioni virali da PRRS, PCV2 e virus influenzale e più frequenti nei soggetti di 4-12 settimane (Li et al., 2009; Palzer et al., 2015; Unterweger et al., 2016).

Le strategie utili alla prevenzione della malattia di Glässer comprendono un buon management degli animali, una adeguata colostratura e la vaccinazione. L'efficacia di quest'ultima risente della circolazione di diverse serovar poiché non si evidenziano fenomeni di cross-protezione, di conseguenza la terapia antibiotica risulta essere ancora la prima scelta, in presenza della malattia (Macedo *et al.*, 2015).

Gli antimicrobici maggiormente utilizzati nei confronti della malattia di Glässer appartengono alle classi dei β-lattamici, fenicoli, macrolidi, tetracicline e sulfamidici potenziati. La possibilità di selezionare microrganismi resistenti in corso di terapia di GP rende necessario un uso prudente e responsabile del farmaco basato, oltre che su una diagnosi certa, sulla sensibilità del ceppo isolato nel focolaio (de la Fuente *et al.*, 2007; Karriker *et al.*, 2019). Con questo studio si è voluta indagare la sensibilità agli antimicrobici di questo microrganismo, viste le scarse informazioni a riguardo, soprattutto in Italia, con la finalità di fornire indicazioni utili relative alle classi di antibiotici utilizzati comunemente in suinicoltura.

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti allo studio 30 ceppi selezionati tra quelli isolati tra il 2017 e il 2022, presso la Sezione Diagnostica di Treviso (IZSVe), e derivanti da esami batteriologici collaterali ad accertamenti anatomo-patologici di suini in svezzamento e magronaggio provenienti da allevamenti veneti. L'isolamento è avvenuto su terreni non selettivi da campioni di bronco (10), polmone (12), milza (1), pericardio (2), cervello (3), peritoneo (1) e articolazione (1) e ciascuno da allevamenti diversi o dallo stesso allevamento a distanza almeno di 6 mesi e da cicli differenti.

L'isolamento è avvenuto su terreno agar cioccolato incubato per 24-48 ore a 37° in condizioni di microaerofilia (5% CO₂) e l'identificazione dei ceppi è stata eseguita tramite MALDI TOF MS (Biotyper Microflex LT, Bruker Daltonics).

La sensibilità è stata valutata attraverso la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) di 9 antimicrobici, ottenuta mediante il metodo della microdiluizione in brodo. Sono stati testati amoxicillina addizionata con acido clavulanico (AUG2), ampicillina (AMP), ceftiofur (CEFT), enrofloxacina (ENRO), florfenicolo (FFN), spectinomicina (SPE), tetraciclina (TET), tilmicosina (TIL), trimethoprim/sulfametoxazolo (SXT) impiegando piastre commerciali (Sensititre, ThermoFisher Scientific).

La coltura in esame è stata stemperata in soluzione fisiologica per ottenere una sospensione di torbidità 0,8 McFarland necessaria all'inoculo dell'Haemophilus Test Medium (HTM) addizionato con 500 µL di sangue lisato di cavallo (LHB). La piastra inoculata con 100

μL di sospensione batterica e incubato in condizioni di microaerofilia per 24-48h. Ogni antimicrobico è stato testato in diluizioni variabili da 0,0156 a 256 μg/ml.

RISULTATI

I valori di MIC degli antimicrobici testati sono riassunti in tabella 1. Le caselle bianche corrispondono alle concentrazioni di antimicrobico che sono state testate, mentre le caselle colorate di arancione sono indicative di concentrazioni testate unicamente nelle piastre antecedenti al 2022. Laddove disponibili, i break-point di resistenza sono indicati in tabella 1 tramite linee doppie verticali (de la Fuente *et al.*, 2007).

	0,075	0,0156	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	MIC ₅₀	MIC ₉₀
AUG2			18		5	4	1	1				1						0,0312	0,25
AMP	9		1	4	9	2	3	1			1							0,125	0,25
CEFT	16		3	2	2	3	2	2										<0,0156	0,25
ENRO	11		5	6	5	2		1										0,0312	0,125
FFN			2		4	13	2	4	3	2								0,25	1
SPE							1		3	5	2	8	3		4	3	1	16	128
TET				4*	5	8	4	2	2		3		2					0,25	2
TIL						2	2	2	5	6	7	1	1	1	2			4	8
SXT			2	1	1	4	1	4	4	5	4	3	1					2	8

^{*} MIC<0.125 per 1 ceppo testato nel 2022

Tabella 1. Distribuzione dei ceppi di *G. parasuis* rispetto alle diverse concentrazioni di principio attivo testato (μ g/ml.) e valori di MIC₅₀ e MIC₉₀.

Table 1. Distribution of *G. parasuis* strians according to the antimicrobic concentration tested (μ g/ml.) and MIC₅₀ and MIC₉₀ value.

DISCUSSIONE

I risultati suggeriscono una diffusa sensibilità degli isolati nei confronti degli antimicrobici comunemente impiegati per il trattamento della malattia di Glässer.

Ampicillina, ceftiofur, enrofloxacina e florfenicolo si sono dimostrati ampiamente efficaci (96-100% di ceppi sensibili). Questo dato si presenta in linea con i risultati di antimicrobicosensibilità relativi a ceppi isolati nel Regno Unito, Danimarca, Spagna e Repubblica Ceca, dove si sono evidenziate solo minime percentuali di ceppi resistenti al florfenicolo (Aarestrup *et al.*, 2004; Nedbalcova *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007).

Pur non essendo disponibile il breakpoint relativo all'amoxicillina addizionata con acido clavulanico, la distribuzione dei ceppi rispetto alle diverse concentrazioni di principio attivo lascia supporre una diffusa sensibilità con il 60% ceppi (18) inibito da concentrazioni di antimicrobico inferiori a quella più bassa testata (0,0625 µg/ml).

I ceppi considerati presentano una distribuzione bimodale per quanto riguarda la spectinomicina con 7 ceppi oltre il breakpoint di sensibilità. Questo dato è concorde con quanto per i ceppi di GP isolati in Spagna tra il 2002 e il 2004, ma si discosta rispetto ai risultati di Aarestrup e colleghi (2004) su ceppi danesi.

Per quanto riguarda tetraciclina e tilmicosina i ceppi presentano una distribuzione gaussiana all'interno del range di diluizioni testato con percentuali di resistenza rispettivamente del 17 e 14% e valori di MIC_{90} uguali o inferiori rispetto ai dati riportati in letteratura (de la Fuente *et al.*, 2007, Dayao *et al.*, 2014).

Il trimethoprim/sulfametoxazolo è l'unico principio attivo per cui si è evidenziata ampia

diffusione di ceppi resistenti (43% degli isolati), fenomeno descritto anche in ceppi isolati in Spagna e in Svizzera, questi ultimi testati con metodo di disco-diffusione (Wissing et al., 2001; de la Fuente et al., 2007). Gli isolati italiani, però, presentano valori di MIC_{50} e MIC_{90} più elevati rispetto a quanto riportato da de la Fuente (2007) e Dayao (2014) e colleghi. Le minime differenze in termini di resistenza riscontrate tra i ceppi italiani e quelli esteri possono derivare dal diverso management degli animali (es: durata del ciclo produttivo e genetica utilizzata) con conseguenti differenze nei protocolli terapeutici.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano una diffusa sensibilità, *in vitro*, dei ceppi Italiani rispetto ai principi attivi testati. L'indisponibilità di Break Point solidi per tale microrganismo, rende l'interpretazione del valore di MIC comunque complicata, anche alla luce delle molteplici localizzazioni del patogeno rispetto alle proprietà di distribuzione dei diversi principi attivi. Future alternative alla terapia antibiotica non possono che passare attraverso pratiche di profilassi diretta e indiretta molto stringenti e queste ultime non possono prescindere dalle caratteristiche antigeniche (serovar in primis) dei ceppi circolanti nel focolaio.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., & Angen, Ø. (2004). "Antimicrobial susceptibility of Haemophilus parasuis and Histophilus somni from pigs and cattle in Denmark". Veterinary microbiology, 101(2), 143-146.
- Aragon V., Segalés J., Tucker A.W. (2019) "Glässer's Disease", Diseases of swine, 844-853
- 3. Dayao, D. A. E., Kienzle, M., Gibson, J. S., Blackall, P. J., & Turni, C. (2014). "Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for Haemophilus parasuis". Veterinary Microbiology, 172(3-4), 586-589.
- de la Fuente, A. M., Tucker, A. W., Navas, J., Blanco, M., Morris, S. J., & Gutiérrez-Martín, C. B. (2007). "Antimicrobial susceptibility patterns of Haemophilus parasuis from pigs in the United Kingdom and Spain". Veterinary microbiology, 120(1-2), 184-191.
- Howell K.J., Peters S.E., Wang J., Hernandez-Garcia J., Weinert L.A., Luan S.L., Chaudhuri R.R., Angen Ø., Aragon V., Williamson S.M., Parkhill J., Langford P.R., Rycroft A.N., Wren B.W., Maskell D.J., Tucker A.W. (2015) "Development of a multiplex PCR for rapid molecular serotyping of Haemophilus parasuis". J. Clin. Microbiol., 9, pp. 01915-01991.
- 6. Karriker, L. A., Coetzee, J. F., Friendship, R. M., & Apley, M. D. (2019). "Drug pharmacology, therapy, and prophylaxis". Diseases of swine, 158-170.
- 7. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. (1992) "Designation of 15 serovars of Haemophilus parasuis on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts". J Clin Microbiol. Apr;30(4):862-5. doi: 10.1128/jcm.30.4.862-865.
- 8. Li JX, Jiang P, Wang Y, Li Y, Chen W., Wang X, Li P. (2009). "Genotyping of Haemophilus parasuis from diseased pigs in China and prevalence of two coexisting virus pathogens" Prev Vet Med 91:274–279.
- 9. Macedo, N., Rovira, A., & Torremorell, M. (2015). "Haemophilus parasuis: infection, immunity and enrofloxacin". Veterinary research, 46(1), 1-6.
- 10. Nedbalcova, K., Satran, P., Jaglic, Z., Ondriasova, R., & Kucerova, Z. J. V. M. (2006). "Haemophilus parasuis and Glässer's disease in pigs: a review". Veterinarni Medicina, 51(5), 168-179.
- 11. Palzer A, Haedke K, Heinritzi K, Zoels S., Ladinig A, and Ritzmann M. (2015).

- "Associations among Haemophilus parasuis, Mycoplasma hyorhinis, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis" Can Vet J 56:285–287.
- 12. Unterweger C, Wöchtl B, Spergser J, Brunthaler R, Untersperger M, Lillie-Jaschniski K, Dürrwald R, Hennig-Pauka I (2016). "Influenza outbreak in weaners with involvement of Mycoplasma hyorhinis and Haemophilus parasuis". A case report Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 44:259–265.
- 13. Wissing A, Nicolet J, Boerlin P. (2001) "The current antimicrobial resistance situation in Swiss veterinary medicine" Schweizer Archiv fur Tierheilkunde. Oct;143(10):503-510. PMID: 11680911.

PRIMA IDENTIFICAZIONE DEI GENI DI RESISTENZA AGLI OXAZOLIDINONI *POXTA2* E *CFR*(D) IN UN ISOLATO DI *STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE* SUBSP. *EQUISIMILIS* DI ORIGINE SUINA

FIRST DETECTION OF THE OXAZOLIDINONE RESISTANCE POXTA2 AND CFR(D) GENES IN STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE SUBSP. EQUISIMILIS OF SWINE ORIGIN

MASSACCI F.R.¹, COCCITTO N.S.², CINTHI M.³, ALBINI E.¹, CUCCO L.¹, ORSINI M.⁴, GIOVANETTI E.³, BRENCIANI A.², MAGISTRALI C.F.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', Perugia, Italy; ²Unit of Microbiology, Department of Biomedical Sciences and Public Health, Polytechnic University of Marche Medical School, Ancona, Italy;

³Unit of Microbiology, Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy;

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova, Italy.

Parole chiave: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, antibiotico-resistenza, oxazolidinoni *Keywords: Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, antibiotic-resistance, oxazolidinones

RIASSUNTO

S. dysgalactiae subsp. equisimilis (SDSE) è un patogeno responsabile di infezioni sia nell'uomo che negli animali da produzione. Gli oxazolidinoni sono farmaci di ultima istanza utilizzati e approvati solo per uso umano, quindi non prescrivibili per uso veterinario, tuttavia anche l'uso di fenicoli e tetracicline può selezionare per geni di resistenza a questa classe antibiotica. Dati recenti indicano la presenza di geni che codificano la resistenza agli oxazolidinoni nelle specie di Enterococcus isolati da allevamenti suini italiani. In questo studio, riportiamo per la prima volta la presenza dei geni poxtA2 e cfr(D) in un ceppo di S. dysgalactiae subsp. equisimilis isolato da un suino proveniente da un allevamento italiano. Abbiamo identificato un nuovo plasmide, denominato pSdyV305, che è il risultato di un evento di ricombinazione tra un piccolo plasmide residente in un ceppo di SDSE e parte del plasmide enterococcico contenente i geni cfr(D)/poxtA2/fexA. La co-localizzazione del gene poxtA2 con cfr(D) era stata descritta in tre isolati di E. faecalis da allevamenti suini italiani. Nell'azienda di origine, il florfenicolo era stato utilizzato nei due anni precedenti all'isolamento batterico, confermando l'importanza della pressione selettiva generata da altre molecole. La segnalazione di poxtA2 in un potenziale agente zoonotico e in un nuovo genere batterico desta serie preoccupazioni per la salute pubblica a livello globale.

ABSTRACT

S. dysgalactiae subsp. equisimilis (SDSE) is a pathogen responsible for infection in humans and livestock. Oxazolidinones are last resort antimicrobial agents used in human medicine and are not administered for veterinary use. However, the use of phenicols or tetracyclines might also select for oxazolidinones resistance genes. Recent data indicate the presence of genes encoding oxazolidinones resistance in Enterococcus species isolated from Italian pig herds. In this study, we first identified a S. dysgalactiae subsp. equisimilis isolate of porcine origin that harbors cfr(D) and poxtA2 genes. We have identified a new plasmid, named pSdyV305, which resulted from a recombination event between a SDSE plasmid

and a region of another plasmid of a porcine Enterococcus faecalis encoding cfr(D)/poxtA2/fexA. Co-location of the poxtA2 with cfr(D) gene was only detected in three E. faecalis isolates from Italian pig herds. In the farm of origin, florfenicol had been used in the two years before the SDSE identification, confirming the importance of the selective pressure generated by other antibiotic molecules. The detection of poxtA2 in a potential zoonotic agent and in a new bacterial genus poses a serious threat to public health, worldwide.

INTRODUZIONE

Streptococcus dysgalactiae è una specie patogena sia per l'uomo che per gli animali. In base alle caratteristiche genetiche e biochimiche, S. dysgalactiae include in due sottospecie: S. dysgalactiae subsp. equisimilis (SDSE) e S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae (SDSD) (Vandamme et al., 1996). Considerato fino a poco tempo fa un patogeno esclusivamente animale, responsabile di infezioni in animali da allevamento, da affezione e selvatici, recentemente S. dysgalactiae è stato segnalato come agente causale di infezioni umane con un quadro clinico sovrapponibile a quello sostenuto da Streptococcus pyogenes (Oppegaard et al., 2017; Baracco, 2019). Infatti, l'infezione da SDSE nell'uomo può causare ascessi cutanei, faringite, artrite, batteriemia, endocardite e sindrome da shock tossico. A causa della gravità dell'infezione da SDSE nell'uomo, sono stati eseguiti studi volti sia alla caratterizzazione molecolare che al potenziale zoonotico di SDSE isolato da animali. Tuttavia, la maggior parte degli studi su SDSE in ambito veterinario sono limitati ai cavalli e solo pochi hanno caratterizzato isolati SDSE di origine suina (Silva et al., 2015; Pinho et al., 2016; Ciszewski and Szewczyk, 2017). Gli oxazolidinoni sono farmaci sintetici di ultima istanza utilizzati esclusivamente in ambito clinico per trattare infezioni causate da batteri Gram-positivi multiresistenti agli antibiotici (MDR) inclusi lo Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA), gli enterococchi vancomicino-resistenti (VRE), gli pneumococchi penicillinoresistenti e i micobatteri MDR. Gli oxazolidinoni, linezolid e tedizolid, legano al centro della peptidil transferasi-nel dominio V dell'rRNA 23S della subunità ribosomiale 50S-provocando l'inibizione della sintesi proteica. La resistenza al linezolid può insorgere in seguito a mutazioni nell'rRNA 23S e nelle proteine ribosomiali L3 e L4, ma anche per l'acquisizione di geni di resistenza trasferibili: cfr, cfr(B), cfr(C), cfr(D), cfr(E), optrA, poxtA e poxtA2 (Brenciani et al., 2022). La resistenza trasferibile è riconducibile a due meccanismi principali: (i) la metilazione post-trascrizionale dell'rRNA 23S da parte delle proteine Cfr e Cfr-like, che conferiscono resistenza a cinque classi di agenti antimicrobici tra cui fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo), lincosamidi, oxazolidinoni (linezolid), pleuromutiline e streptogramina di gruppo A (fenotipo PhLOPS_A) (Long et al., 2006), e (ii) la protezione ribosomiale operata da proteine ABC-F quali OptrA, PoxtA e PoxtA2 con ridotta sensibilità a fenicoli e oxazolidinoni (incluso il tedizolid) (Brenciani et al., 2022). Sebbene gli oxazolidinoni siano stati approvati ad esclusivo uso umano, è stato rilevato un preoccupante aumento nel numero di enterococchi resistenti al linezolid sia in ambito veterinario (Fioriti et al., 2020; Brenciani et al., 2022; Cinthi et al., 2022; Coccitto et al., 2022) che ambientale (Ruiz-Ripa et al., 2020; Biggel et al., 2021; Fioriti et al., 2021). Il florfenicolo, ampiamente utilizzato in medicina veterinaria per trattare le infezioni degli animali da produzione, grazie o ad eventi di co-selezione, sembrerebbe favorire la diffusione, non solo di geni di resistenza ai fenicoli, ma anche di quelli agli oxazolidinoni, con conseguenze potenzialmente gravi per la salute umana. Per quanto riguarda il genere Streptococcus, i geni cfr, cfr(D) e optrA sono stati individuati solo in isolati cinesi di Streptococcus suis e S. parasuis di origine suina e in isolati clinici di S. agalactiae (Brenciani et al., 2022).

In questo studio, riportiamo per la prima volta la presenza dei geni *poxtA2* e *cfr*(D) in un ceppo di *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolato da un suino.

MATERIALI E METODI

Il ceppo batterico SDSE (V305) è stato isolato dal cervello di un suino affetto da polisierosite nel 2020 in Centro Italia. Il suino proveniva da un allevamento da ingrasso che allevava circa 120 suini/anno e che ha utilizzato il florfenicolo a scopo terapeutico nel 2019 e nel 2020. La colonia con morfologia riconducibile a SDSE, cresciuta in Agar Sangue (5% globuli rossi di montone) a 37°C in CO₂, è stata identificata mediante Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF Biotyper, Bruker Daltonics). I test di sensibilità agli antibiotici sono stati eseguiti mediante il metodo della microdiluizione in brodo ed interpretati seguendo i breakpoint clinici EUCAST (versione 12.0, www.eucast.org).

Il DNA genomico di V305 è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) e mediante saggi di PCR sono stati ricercati geni noti responsabili di resistenza agli oxazolidinoni (Fioriti et al., 2020). I geni trovati sono stati quindi sequenziati mediante il metodo Sanger.

Il DNA genomico di V305 è stato successivamente sequenziato utilizzando la piattaforma Illumina NextSeq 500. Dopo le fasi di trimming e valutazione della qualità, le sequenze sono state assemblate usando SPAdes genome assembler v3.11.1 (Bankevich et al., 2012)a new assembler for both single-cell and standard (multicell. La sequenza ottenuta è stata utilizzata per la determinazione del Sequence Type (ST) utilizzando il database MLST per S. dysgalactiae (https://pubmlst.org/organisms). I geni di virulenza sono stati ricercati utilizzando BLASTN v2.13.0 (Camacho et al., 2009). Inoltre, al fine di caratterizzare gli elementi genetici di cfr(D) e poxtA2, il genoma del ceppo SDSE V305 è stato ulteriormente sequenziato mediante MinION utilizzando un approccio long-read sequencing. Successivamente è stato eseguito un assemblaggio ibrido, mediante Unicycler v. 0.4.8 (https://github.com/rrwick/Unicycler), degli output delle piattaforme Illumina e Nanopore, seguito dall'annotazione utilizzando il server online Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST; https://rast.nmpdr.org/). Il resistoma del ceppo è stato studiato utilizzando la piattaforma online del Center for Genomic Epidemiology (CGE) e nello specifico il tool ResFinder 4.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder). La stabilità dei contesti genetici è stata valutata mediante saggi di PCR inversa utilizzando coppie di primer interne a poxtA (5' – TTGGATTTTTGTCCGCCTGAA – 3') e fexA (5' – TTGGATTTTTGTCCGCCTGAA – 3') e dirette verso l'esterno.

RISULTATI

I test di sensibilità agli antibiotici hanno mostrato che SDSE V305 era resistente a tetraciclina, eritromicina, gentamicina, clindamicina, enrofloxacina e florfenicolo e sensibile a penicillina, ampicillina e ceftiofur, linezolid e tedizolid, cloramfenicolo e sulphametoxazolo+trimethoprim (Tabella 1). I risultati di PCR hanno evidenziato la presenza dei geni cfr(D) e poxtA. Il sequenziamento di Sanger ha rivelato che, mentre il gene cfr(D) era identico al $wild\ type$, il gene poxtA era in realtà la variante poxtA2.

SDSE V305 è risultato positivo per i geni di virulenza hasC, fbp54, mf3. L'isolato mostrava un complesso resistoma: oltre a cfr(D) e poxtA2, erano rilevabili fexA (resistenza ai fenicoli), tet(O) (resistenza alle tetracicline), lnu(B) (resistenza a lincosamidi), lsa(E) (resistenza a lincosamidi, streptogramina di gruppo A e pleuromutiline) e ant(6)-Ia (resistenza agli aminoglicosidi).

Tabella 1. Valori di MIC di SDSE V305 per le diverse molecole antibiotiche testate. *Table 1.* MIC values of SDSE V305 for each tested antibiotic molecules.

Antibiotico	MIC (μg/ml)
Ceftiofur	0.25
Tetraciclina	32
Gentamicina	4
Florfenicolo	16
Penicillina	0.12
Enrofloxacin	1
Clindamicina	4
Eritromicina	128
Linezolid	2
Cloramfenicolo	8
Sulphametoxazolo+trimethoprim	1
Ampicillina	0.25
Tedizolid	0.25
Vancomicina	0.25

L'analisi WGS ha escluso la presenza di mutazioni ribosomiali e rivelato che SDSE V305 apparteneva ad un nuovo ST634 (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_sdysgalactiae_isolates).

L'analisi bioinformatica ha mostrato la presenza di un plasmide di 18.514 bp, denominato pSdyV305 (numero d'accesso: OQ299016) con 36 *Open Reading Frames* (ORFs) e un contenuto in G+C del 36%. Uno studio più approfondito ha evidenziato che pSdyV305 (Figura 1) è il risultato di un evento di ricombinazione tra il plasmide pSDSE159 (3.038 bp) di SDSE 159 (numero d'accesso: AP023395) e una regione del plasmide pV386 (16.111 bp) di *Enterococcus faecalis* V386 (numero d'accesso: MZ603802) di origine suina contenente i geni *cfr*(D)/*poxtA2/fexA* (Cinthi et al., 2022). In pSdyV305, a seguito dell'inserzione della regione *cfr*(D)/*poxtA2/fexA* in corrispondenza dell'estremità 5' del gene *repB*, 31 bp del gene *wild type* erano rimpiazzati da 33 nuovi nucleotidi. Inoltre, questa regione, fiancheggiata da due elementi IS*1216* con lo stesso orientamento, mostrava una duplicazione del sito bersaglio di 8 bp (GACAAGAG) (Figura 2).

Esperimenti di PCR inversa, hanno prodotto un amplicone di 3.213 bp sia in pV386 che in pSdyV305, dimostrando l'instabilità della regione che veicola i geni *cfr*(D)/*poxtA2*/*fexA* (Figura 2).

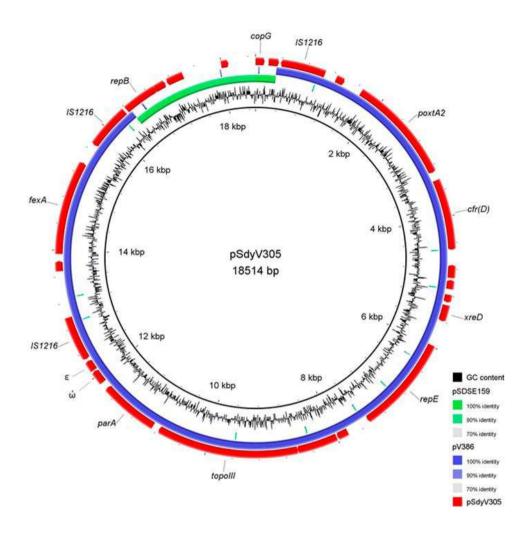


Figura 1. In figura sono messe a confronto le mappe circolari di pSdyV305 e di altri plasmidi, generate utilizzando il software BRIG. I plasmidi inclusi nell'analisi sono i seguenti (dall'interno verso l'esterno): (i) pSDSE di SDSE 159 (numero d'accesso: AP023395), (ii) pV386 di *E. faecalis* 386 (numero d'accesso: MZ603802); (iii) pSdyV305 di SDSE V305 (numero d'accesso: OQ299016). Le frecce rosse indicano le posizioni e gli orientamenti dei geni. Inoltre, vengono mostrati alcuni determinanti di resistenza agli antibiotici e alcuni geni significativi descritti in questo studio.

Figure 1. Circular map of the pSdyV305 plasmid in comparison with other plasmids using BRIG software. Plasmids included in the analysis were as follows: (inner to outer circles) pSDSE of SDSE 159 (accession no. AP023395), pV386 of *E. faecalis* 386 (accession no. MZ603802) and pSdyV305 of SDSE V305 (accession no. OQ299016). Red arrows indicate the positions and orientations of genes; some antibiotic resistance determinants and relevant genes described in this study are shown.

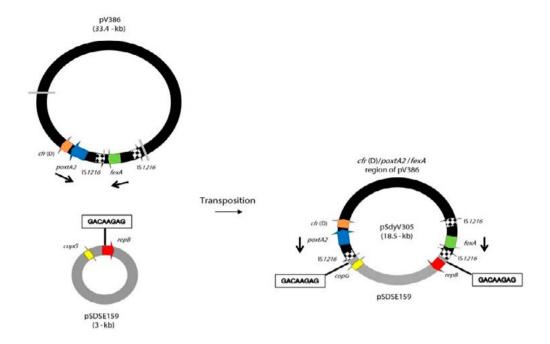


Figure 2. Rappresentazione grafica, non in scala, del processo di trasposizione mediante il quale pSDSE159 può ricombinarsi con pV386 per formare il plasmide pSdyV305 in SDSE V305. Le frecce sottili indicano i primer utilizzati per i test di stabilità. Le sequenze da 8 bp (GACAAGAG) sono rappresentate nel riquadro.

Figure 2. Graphical representation, not in scale, of a transposition process by which pSDSE159 may recombine with pV386 to form pSdyV305 plasmid in SDSEV305 strain. Thin arrows indicate the primers used for stability tests. The 8 bp sequences (GACAAGAG) are represented in the box.

DISCUSSIONE

Il presente lavoro riporta la prima segnalazione del gene *poxtA2*, un determinante di resistenza agli oxazolidinoni, in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

Ad oggi, poxtA2 è stato segnalato solo in enterococchi prevalentemente di origine animale e la sua co-localizzazione con cfr(D) è stata descritta solo in tre ceppi di E. faecalis isolati da suini e da alimenti di origine animale (Brenciani et al., 2022).

Gli antibiotici somministrati in zootecnia sono spesso gli stessi usati in medicina umana o appartengono alla stessa classe farmacologica. Per preservarne l'efficacia terapeutica e limitare il diffondersi di patogeni resistenti, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha individuato e classificato alcuni antibiotici critici per l'uomo (*critically important antimicrobials*, CIA). Secondo la classificazione dell'OMS, gli oxazolidinoni rientrano tra le classi antimicrobiche di importanza critica per la salute dell'uomo con una alta priorità. Nostri precedenti studi hanno documentato l'emergenza e la diffusione di geni di resistenza agli oxazolidinoni in enterococchi isolati da allevamenti suini (Fioriti et al., 2020; Cinthi et al., 2022; Coccitto et al., 2022)isolated from swine fecal samples collected from 76 pig farms, were investigated for the presence of optrA, cfr, and poxtA genes by PCR. Thirty florfenicol-resistant Enterococcus isolates had at least one linezolid resistance gene. optrA was found to be the most widespread linezolid resistance gene (23/30, pertanto appare

sempre più evidente il ruolo di serbatoio di geni di linezolid-resistenza, potenzialmente trasmissibili ai patogeni umani, svolto dai suini con gravi conseguenze per la salute umana. È interessante notare che il plasmide caratterizzato nel presente studio, pSdvV305, sia il risultato di un evento di ricombinazione tra un piccolo plasmide residente in un ceppo di SDSE e parte del plasmide enterococcico contenente i geni cfr(D)/poxtA2/fexA (Cinthi et al., 2022). L'utilizzo del florfenicolo negli allevamenti suinicoli, che determina una pressione selettiva sulle popolazioni batteriche, potrebbe essere responsabile di questo evento di ricombinazione. Infatti, è noto che l'acquisizione della resistenza agli oxazolidinoni sia associata all'uso di fenicoli [legati ad optrA e cfr(D)] o tetracicline (legati a poxtA) negli allevamenti di animali da produzione (Antonelli et al., 2018; Elghaieb et al., 2019; Na et al., 2020; Ruiz-Ripa et al., 2020)C10004 and C10009, were recovered from air samples of a Spanish swine farm and comprehensively characterized. Methods Detection of linezolid resistance mechanisms (mutations and acquisition of resistance genes, Pertanto, la presenza dei geni poxtA2 e cfr(D) nel nostro isolato potrebbe essere correlata ad un fenomeno di selezione innescato dall'impiego di queste molecole antibiotiche in azienda. L'ampio utilizzo di florfenicolo a fini terapeutici nei due anni precedenti l'isolamento batterico, potrebbe sostenere questa ipotesi.

CONCLUSIONI

La segnalazione dei geni poxtA2 e cfr(D) in un potenziale agente zoonotico e in un nuovo genere batterico desta serie preoccupazioni per la salute pubblica a livello globale. Sarebbe auspicabile implementare il monitoraggio di batteri resistenti agli oxazolidinoni negli animali destinati alla produzione alimentare, al fine di limitarne la diffusione. L'impiego di antibiotici, in particolare di fenicoli, in zootecnica dovrebbe pertanto essere limitato al

fine di preservare l'efficacia terapeutica di farmaci last-resort come gli oxazolidinoni.

BIBLIOGRAFIA

- Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Brenciani, A., Galeotti, C.L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P.E., Rossolini, G.M., 2018. Characterization of poxtA, a novel phenicoloxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1763–1769. doi:10.1093/jac/dky088
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
- 3. Baracco, G.J., 2019. Infections Caused by Group C and G Streptococcus (Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. Microbiol. Spectr. 7. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0016-2018
- 4. Brenciani, A., Morroni, G., Schwarz, S., Giovanetti, E., 2022. Oxazolidinones: mechanisms of resistance and mobile genetic elements involved. J. Antimicrob. Chemother. 77, 2596–2621. doi:10.1093/jac/dkac263
- 5. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10, 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421
- Cinthi, M., Coccitto, S.N., Morroni, G., D'Achille, G., Brenciani, A., Giovanetti, E., 2022. Detection of an Enterococcus faecium Carrying a Double Copy of the PoxtA Gene from Freshwater River, Italy. Antibiot. (Basel, Switzerland) 11. doi:10.3390/ antibiotics11111618

- 7. Ciszewski, M., Szewczyk, E.M., 2017. Potential Factors Enabling Human Body Colonization by Animal Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis Strains. Curr. Microbiol. 74, 650–654. doi:10.1007/s00284-017-1232-z
- 8. Coccitto, S.N., Cinthi, M., Fioriti, S., Morroni, G., Simoni, S., Vignaroli, C., Garofalo, C., Mingoia, M., Brenciani, A., Giovanetti, E., 2022. Linezolid-resistant Enterococcus gallinarum isolate of swine origin carrying cfr, optrA and poxtA genes. J. Antimicrob. Chemother. 77, 331–337. doi:10.1093/jac/dkab408
- Crowe-McAuliffe, C., Murina, V., Turnbull, K.J., Huch, S., Kasari, M., Takada, H., Nersisyan, L., Sundsfjord, A., Hegstad, K., Atkinson, G.C., Pelechano, V., Wilson, D.N., Hauryliuk, V., 2022. Structural basis for PoxtA-mediated resistance to phenicol and oxazolidinone antibiotics. Nat. Commun. 13, 1860. doi:10.1038/s41467-022-29274-9
- Elghaieb, H., Freitas, A.R., Abbassi, M.S., Novais, C., Zouari, M., Hassen, A., Peixe, L., 2019. Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying poxtA or optrA in retail meat and food-producing animals from Tunisia. J. Antimicrob. Chemother. 74, 2865–2869. doi:10.1093/jac/dkz263
- Fioriti, S., Morroni, G., Coccitto, S.N., Brenciani, A., Antonelli, A., Di Pilato, V., Baccani, I., Pollini, S., Cucco, L., Morelli, A., Paniccià, M., Magistrali, C.F., Rossolini, G.M., Giovanetti, E., 2020. Detection of Oxazolidinone Resistance Genes and Characterization of Genetic Environments in Enterococci of Swine Origin, Italy. Microorganisms 8. doi:10.3390/microorganisms8122021
- 12. Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B., 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2500–2505. doi:10.1128/AAC.00131-06
- 13. Biggel, M., Magdalena, N.-I., Christoph, J., A., S.M.J., Roger, S., 2021. Genetic Context of optrA and poxtA in Florfenicol-Resistant Enterococci Isolated from Flowing Surface Water in Switzerland. Antimicrob. Agents Chemother. 65, e01083-21. doi:10.1128/AAC.01083-21
- Na, S.-H., Moon, D.-C., Kim, M.-H., Kang, H.-Y., Kim, S.-J., Choi, J.-H., Mechesso, A.-F., Yoon, S.-S., Lim, S.-K., 2020. Detection of the Phenicol-Oxazolidinone Resistance Gene poxtA in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis from Food-Producing Animals during 2008-2018 in Korea. Microorganisms 8. doi:10.3390/ microorganisms8111839
- Oppegaard, O., Mylvaganam, H., Skrede, S., Lindemann, P.C., Kittang, B.R., 2017.
 Emergence of a Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis stG62647-lineage associated with severe clinical manifestations. Sci. Rep. 7, 7589. doi:10.1038/s41598-017-08162-z
- Pinho, M.D., Erol, E., Ribeiro-Goncalves, B., Mendes, C.I., Carriço, J.A., Matos, S.C., Preziuso, S., Luebke-Becker, A., Wieler, L.H., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., 2016. Beta-hemolytic Streptococcus dysgalactiae strains isolated from horses are a genetically distinct population within the Streptococcus dysgalactiae taxon. Sci. Rep. 6, 1–9. doi:10.1038/srep31736
- 17. Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Eichhorn, I., Schwarz, S., Torres, C., 2020. Detection of poxtA- and optrA-carrying E. faecium isolates in air samples of a Spanish swine farm. J. Glob. Antimicrob. Resist. 22, 28–31. doi:https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.012
- Silva, L.G., Genteluci, G.L., Corrêa de Mattos, M., Glatthardt, T., Sá Figueiredo, A.M., Ferreira-Carvalho, B.T., 2015. Group C Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis in south-east Brazil: genetic diversity, resistance profile and the first report of human

- and equine isolates belonging to the same multilocus sequence typing lineage. J. Med. Microbiol. 64, 551–558. doi:10.1099/jmm.0.000052
- Simona, F., Nina, C.S., Nicholas, C., Serena, S., Gianluca, M., Andrea, B., Gianmarco, M., Carla, V., Luigi, V., Francesca, B., Eleonora, G., 2021. Linezolid Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sediment and Zooplankton in Two Italian Coastal Areas. Appl. Environ. Microbiol. 87, e02958-20. doi:10.1128/AEM.02958-20
- 20. Vandamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K., Devriese, L.A., 1996. Taxonomic study of lancefield streptococcal groups C, G, and L (Streptococcus dysgalactiae) and proposal of S. dysgalactiae subsp. equisimilis subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 774–781. doi:10.1099/00207713-46-3-774

EFFETTI DELLA SOSTITUZIONE DELL'OSSIDO DI ZINCO CON UNA COMBINAZIONE DI ADDITIVI ALGALI (β-1,3-GLUCANO, BACILLUS SP. PB6 E ACIDO FORMICO) SULLE PRESTAZIONI DEI SUINI SVEZZATI

HANDS R., SARGEANT E., VAN VEGGEL N., AMORY J., NETO R., CHIKUNYA S.

Writtle University College, Dipartimento di Scienze Animali, CM1 3RR, Chelmsford, UK Kemin Europa nv

Applicazione: La combinazione del prebiotico di tipo β -glucano con un probiotico (Bacillus sp. PB6) e l'acido formico sembra essere un'efficace sostituzione dello ZnO nelle diete dei suinetti svezzati

INTRODUZIONE

L'ossido di zinco (ZnO) è stato utilizzato ad alte dosi come additivo alimentare per ridurre l'incidenza e la gravità della diarrea post-svezzamento nei suini (Bonetti et al. 2021). Dal giugno 2022, l'uso terapeutico di livelli sovra nutrizionali di ZnO nei suini è stato vietato a causa delle preoccupazioni sull'inquinamento ambientale. Questo studio ha valutato l'efficacia dell'utilizzo di una combinazione di additivi AletaTM (β -1,3-glucano da alghe), CLOSTAT® (Bacillus sp. PB6) e FormylTM (acido formico e citrico incapsulati) per sostituire lo ZnO nei suinetti post-svezzamento.

MATERIALI E METODI

I suinetti svezzati (380) sono stati bilanciati per sesso e peso e poi ripartiti in modo randomizzato tra due diete. Al gruppo di controllo è stata offerta una dieta pre-starter commerciale standard con ZnO (2500 ppm) dal 28° al 42° giorno, seguita da una dieta starter senza ZnO dal 43° al 70° giorno. Il gruppo di trattamento ha ricevuto una dieta di partenza priva di ZnO, con AletaTM (200 g/ton) + CLOSTAT® (2 x 108 CFU/kg) + FormylTM (2 kg/ton) dal 28 al 42 giorno, seguita da una dieta di partenza con AletaTM (200 g/ton) + CLOSTAT® (1 x 108 CFU/kg) dal 43 al 70 giorno. La prova è stata condotta in lotti per tre periodi. In ogni lotto sono stati assegnati 3 recinti a ciascuna dieta, replicati in 3 periodi per un totale di 9 recinti per trattamento. Sono stati misurati il peso corporeo, la mortalità dei suinetti e i parametri fecali (punteggi di consistenza, pH, sostanza secca (DM)). I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via con il lotto utilizzato come blocco in Genstat.

RISULTATI

La mortalità dei suinetti dopo lo svezzamento è stata bassa e simile con entrambe le diete. Anche i parametri fecali, come la sostanza secca, i punteggi di consistenza e il pH, erano simili in tutte le diete. Gli additivi utilizzati per sostituire lo ZnO hanno prodotto tassi di crescita e guadagni medi giornalieri simili tra i giorni 28 e 42 (Tabella 1). I suini del gruppo trattato erano più pesanti (29,9 kg) rispetto a quelli con la dieta standard (28,9 kg) (P=0,029). I guadagni medi giornalieri dal 28° al 70° giorno sono stati più elevati nei suini che hanno assunto il sostituto dello Zn ossido (512 vs 490 g/giorno, P=0,003).

Tabella 1: Effetti della sostituzione dello ZnO nella dieta dei suinetti svezzati sulle loro prestazioni dal 28° al 70° giorno di vita.

Parametri	Età	Controllo	Trattamento	Sed	Significatività
Liveweight (kg)	42 d	12.90	12.78	0.219	NS
	56 d	19.95	20.32	0.316	NS
	70 d	28.88	29.76	0.405	P=0.029
ADG (g/day)	28-42d	329	318	9.73	NS
	28-56 d	416	428	7.67	NS
	28-70 d	490	512	7.30	P=0.003
	42-70 d	560	608	9.69	<i>P</i> <0.001W
	56-70 d	636	678	14.89	P=0.006

ADG = incremento medio giornaliero, sed = errore standard della differenza; NS = non significativa

CONCLUSIONI

La combinazione di additivi utilizzata ha permesso di ottenere livelli di performance comparabili nei suini e, in alcuni casi, di superare la dieta tradizionale a base di ZnO. Il miglioramento delle prestazioni con la dieta priva di ZnO si è tradotto in suini più pesanti di circa 1 kg al 70° giorno.

RINGRAZIAMENTI

Kemin per il finanziamento. ForFarmers per la formulazione e la fornitura delle diete

BIBLIOGRAFIA

Bonetti, A Tugnoli, B. Piva, A. Grilli, E. 2021. Animals (Basel), 11(3), pp642

VALUTAZIONE DEL RUOLO DI BERGEYELLA ZOOHELCUM NEL COMPLESSO DELLA MALATTIA RESPIRATORIA DEL SUINO

EVALUATION OF BERGEYELLA ZOOHELCUM'S ROLE IN THE PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX

PUPILLO G., BARISELLI S., TORRI D., GHERPELLI Y., DE LORENZI G., DOTTORI M.

Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – sezione di Reggio Emilia

Parole chiave: Bergeyella, PRDC, microbiota *Keywords*: Bergeyella, PRDC, microbiote

RIASSUNTO

Bergeyella zoohelcum è un bacillo, gram-negativo, catalasi ed ossidasi positivo, appartenente alla famiglia Weeksellaceae, noto in medicina umana per essere il responsabile di rari ma gravi casi clinici, legati soprattutto a ferite da morso di cani e gatti. Il ruolo in medicina veterinaria non è noto, con rare segnalazioni in forme morbose legate all'isolamento da gatti e suini con sintomatologia respiratoria. Maggiori informazioni si hanno sul riscontro di Bergevella nella normale flora orale, nasale e delle basse vie respiratorie in diverse specie animali, compreso il suino. In questo studio retrospettivo riportiamo l'isolamento di 5 ceppi di B. zoohelcum da carcasse e visceri di suino, conferiti presso la sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) durante l'anno 2022, riportanti in anamnesi segni respiratori e presentanti all'esame anatomopatologico lesioni macroscopiche ascrivibili al complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC). Alla luce di recenti studi che dimostrano la presenza di B. zoohelcum nelle vie aeree, dell'individuazione di alcuni fattori di virulenza e profili di antimicrobicoresistenza uniti alla crescente attenzione al microbiota ed alle sue modificazioni in risposta a stimoli di diversa natura cui gli esseri viventi possono essere sottoposti, discutiamo il possibile ruolo che B. zoohelcum può avere come agente eziologico del PRDC o come indicatore di dismicrobismo delle vie aeree.

ABSTRACT

Bergeyella zoohelcum is a rod shaped bacteria, gram-negative stain, catalase and oxidase positive, member of the family Weeksellaceae, known in human medicine as responsible of rare but severe human clinical cases, mostly related to dogs and cats bites. Its role in veterinary medicine is not yet been clarified, due to lack of information as causative agent of infection, to date isolated only from cats and swine presenting respiratory signs. Much more information is available on the presence of Bergeyella in oral, nasal and respiratory low tract microflora in different animal species, including pigs. In this retrospective study we report the isolation of B. zoohelcum strains from carcasses and swine organs, analyzed by the Reggio Emilia department of Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna during 2022, presenting as anamnestic data respiratory signs and macroscopic lesions referable to Porcine respiratory disease complex (PRDC). Considering recent studies reporting the presence of B. zoohelcum in swine airways, the presence of some virulence factors and antimicrobial resistance profile and considering the growing attention to the microbiota and its modifications when the organism is exposed to different kind of stressors, the possible role of B. zoohelcum as new etiological agent in the PRDC or as airways dismicrobism indicator is discussed.

INTRODUZIONE

Le informazioni sul normale microbiota delle vie respiratorie del suino ed ancor di più sulle modifiche dello stesso, in risposta a diversi fattori, non sono ancora approfonditamente state studiate. In generale, lo studio del microbiota di diversi sistemi ed apparati in primo luogo dell'uomo, ma anche di molte specie animali di interesse zootecnico e non, stanno portando alla luce nuove e interessanti informazioni. utilizzabili in ambito di valutazione del benessere e/o in ottica di diagnostica (Pirolo et al. 2021). Dato il numero di microrganismi che risiedono nell'apparato digerente, questo risulta il distretto anatomico più studiato, ma sempre più, anche grazie all'avanzamento delle tecnologie usate a fini di ricerca, gli altri apparati sono oggetto di approfondimenti. Il microbioma respiratorio del suino è stato recentemente indagato da alcuni studi che hanno valutato la flora batterica delle alte e delle basse vie respiratorie, sia in animali sani che affetti da malattia respiratoria (Pirolo et al., 2021). L'interesse deriva dal grave impatto che il complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC) ha nella suinicoltura mondiale, trattandosi per di più di una condizione ad eziologia multifattoriale sia dal punto di vista microbiologico che ambientale/gestionale (Opriessnig, 2011). I microrganismi coinvolti nel PRDC sono ripartibili in agenti primari rappresentati da Mycoplasma hyopneumoniae, Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus (PRRS), Virus dell'influenza suina (SIV), Circovirus suino di tipo 2 (PCV2) e Virus della Malattia di Aujeszky (MA) e agenti secondari come Pasteurella multocida, Streptococcus suis, Glaesserella parasuis, Bordetella bronchiseptica, Trueperella pvogenes e Actinobacillus pleuropneumoniae (Brockmeier et al., 2002). Non rientra tra questi Bergevella zoohelcum, batterio associato principalmente a rari ma gravi casi clinici umani come ascessi, setticemie e celluliti a seguito di morsi da cane e gatto (Lin et al., 2007; Montejo et al., 2001; Reina e Borrell, 1992). In medicina veterinaria. B. zoohelcum è stato dimostrato far parte del normale microbiota nasale ed orale del cane, del gatto e di altri mammiferi, tra cui il suino (Bailie et al.. 1978: Talan et al., 1999; Arriba et al., 2018), ma ad oggi sono stati riportati in patologia veterinaria solamente l'isolamento da tampone nasale di gatto e di suini presentanti sintomatologia respiratoria (Decoster et al., 2002; Zamora et al., 2016). B. zoohelcum è un bacillo Gram-negativo, non sporigeno, ossidasi e catalasi positivo, conosciuto fino al 1994 come Weeksella zoohelcum, con l'introduzione, su proposta di Vandamme, del genere Bergeyella (Vandamme et al., 1994), cui sono state recentemente assegnate altre 2 specie: B. porcorum e B. cardium (Sohn et al., 2015; Zamora et al., 2016). In patologia suina, al giorno d'oggi, non è un batterio ricercato nella routine diagnostica né si hanno molti dati in bibliografia a supporto del suo potenziale patogeno. In questo studio retrospettivo si descrive l'isolamento di B. zoohelcum in 5 diversi conferimenti di carcasse e visceri di suino, conferiti presso la sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER nel 2022, da aziende del Nord Italia, presentanti in anamnesi sintomi riferibili a patologia respiratoria e lesioni anatomopatologiche macroscopiche ascrivibili al PRDC.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio retrospettivo 5 conferimenti di visceri e carcasse di suino, consegnati presso la sezione Reggio Emilia dell'IZSLER nell'anno 2022 per la ricerca di agenti del PRDC mediante esame batteriologico e indagini di biologia molecolare e/o conferma istologica di malattia da PCV2. Ogni isolato incluso nel lavoro corrisponde ad un singolo allevamento del Nord Italia ed in caso di isolamento da più di un campione dello stesso conferimento, è stato riportato come unico caso. Trattandosi di uno studio retrospettivo di analisi eseguite su richiesta di privati, non sono state eseguite

costantemente le stesse indagini, anche alla luce del fatto che le informazioni relative ai focolai di malattia respiratoria sono in molti casi riportati con sintomatologia differente e non sempre il conferente autorizza l'esecuzione di approfondimenti diagnostici al di fuori dei propri sospetti. Routinariamente le carcasse e/o parti di esse, sono soggette ad un esame necroscopico con approccio sistematico da cui si prelevano campioni da sottoporre alle analisi richieste.

Esame colturale

I campioni da sottoporre all'esame batteriologico, nel dettaglio il parenchima polmonare ed i bronchi, sono seminati su terreno Agar globuli addizionato con β-nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) (AG+C), Hektoen enteric agar (HEA) ed agar siero (AS), questi ultimi due terreni incubati in termostato a 37 ± 1 °C in condizioni di aerobiosi e, allo stesso range di temperatura, ma in condizioni di pressione parziale di CO, 5-10% le piastre di AG+C, con una prima lettura a 24 ore seguita da un'altra, definitiva, a 48 ore. Ad entrambe le letture si riporta su un foglio di lavoro standard quanto osservato. Le colonie isolate con caratteristiche morfologiche tipiche di agenti patogeni del distretto considerato sono trapiantate e/o sottoposte ad eventuali tipizzazioni ulteriori. Se la specie batterica lo permette ne viene valutato il profilo di antibiotico sensibilità mediante individuazione della concentrazione minima inibente (MIC) in brodo. Inoltre, per i campioni oggetto di questo studio, terminato il periodo di incubazione, colonie non presenti alla prima lettura a 24 ore, ma riscontrate a 48 ore in coltura pura o preponderanti, non emolitiche, mucose, grigio-biancastre e parzialmente confluenti, presenti su AG+C e AS, non presenti su HEG, catalasi ed ossidasi positive, sono state trapiantate su Agar globuli (AG) e dopo 24 ore di incubazione tipizzate mediante spettrometria di massa "Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight" (MALDI-TOF).

Concentrazione minima inibente (MIC)

L'antibiogramma è stato eseguito su colonie trapiantate su AG, dopo 24 ore di incubazione a 37 ± 1 °C. La metodica utilizzata è quella della MIC in brodo, utilizzando le molecole incluse nel pannello utilizzato di routine per i patogeni respiratori, riportato in tabella 2. La lettura è stata eseguita dopo 24 ore di incubazione in termostato a 35 ± 1 °C.

Altri approfondimenti

Parti di tessuto, in sede necroscopica, sono stati posti in contenitori sterili per essere successivamente congelatia -20°C o fissati in formalina tamponata al 10%, rispettivamente per l'esecuzione di ricerche mediante metodi di biologia molecolare (PCR tradizionale o PCR-Real Time) o esame istologico ed immunoistochimico. Mediante PCR tradizionale sono stati ricercati: PRRSV, *A. pleuropneumoniae* e *G. parasuis*; mediante PCR-Real Time: SIV (con tipizzazione mediante PCR multiplex), *M. hyopneumoniae*, PCV2 (con metodo quantitativo). Esame istologico ed immunoistochimico eseguiti soltanto su linfonodi se presentanti una carica virale di PCV2 maggiore o uguale a 1x106 copie genomiche virali/grammo.

RISULTATI

I risultati sono riportati di seguito, schematicamente, sotto forma di tabella.

Tabella 1. Risultati ottenuti dagli accertamenti diagnostici. M. hyopneumoniae = M. hyop; G. parasuis = G. para; A. pleuropneumoniae = A. pp **Table 1**. Results obtained by diagnostic exams. M. hyopneumoniae = M. hyop; G. parasuis

= G. para; A. pleuropneumoniae = A. pp

		lesioni	esame		BIOLOGIA MOLECOLARE								
ID	matrice	macroscopiche	colturale	PPRS	SIV (tipizzazione)	PCV2 (copie genomiche/g)	M. hyop	G.para (fibrina)	A.pp				
1	carcassa	piccole aree di consolidamento polmonare multifocali e pleurite fibrinosa lieve diffusa	B. zoohelcum + S. suis non tipizzabile	P	P (H1N1)	-	-	Р	-				
2	corata	consolidamento polmonare localizzato alle aree cranio-ventrali	B. zoohelcum	N	P (H1N2)	-	N	-	-				
3	corata	broncopolmonite catarral-purulenta alle aree cranio ventrali	B. zoohelcum	N	N	8x10 ⁶	-	-	N				
4	corata	lieve plerurite fibrinosa diffusa, broncopolmonite catarral-purulenta alle aree cranio- ventrale.	B. zoohelcum + T. pyogenes	P	N	1,5x10 ¹⁶	-	P	-				
5	visceri	lieve splenomegalia, pleurite e pericardite fibrinosa	B. zoohelcum	P	-	4,1x10 ⁶	-	-	-				

Tabella 2. profili di antibiotico-sensibilità dei 5 ceppi di B. zoohelcum: valori di MIC e range di concentrazione antibiotiche testate.

Table 2. Antibiotic sensitivity profile of the 5 B. zoohelcum strains: MIC values and concentrations range tested.

	Isolato							
Molecola (range di concentrazione testato)	1	2	3	4	5			
Amoxicillina + Ac.Clavulanico (0,0625-16 μg/mL)	0,5	0,25	1	0,5	2			
Ampicillina (0,015625-16 μg/mL)	8	1	2	4	4			
Ceftiofur (0,0625-8 μg/mL)	0,5	≤0,0625	0,125	≤0,0625	< 0,0625			
Enrofloxacin (0, 03125-2 µg/mL)	>2	≤0,03125	≤0,03125	≤0,03125	≤0,03125			
Florfenicolo (0,25-8 μg/mL)	2	≤0,25	0,5	≤0,25	≤0,25			
Flumequina (2-16 μg/mL)	>16	≤2	≤2	≤2	≤2			

DISCUSSIONE

Nell'anno 2022, presso la sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER è stata isolata *B. zoohelcum* da parenchima polmonare suino di 5 diversi conferimenti. Si tratta di una numerosità molto bassa comparata al numero di esami svolti presso la suddetta sezione, ma l'isolamento è stato preso in considerazione ed approfondito poiché la crescita batterica è risultata abbondante e in purezza (eccezion fatta per il campione 1 e 4). Il criterio di abbondanza e purezza di una specie batterica all'esame colturale si applica routinariamente in campo diagnostico, soprattutto laddove si valutino distretti anatomici con una normale flora batterica residente; pertanto l'applicazione di questi criteri permette di dare rilevanza o meno a una crescita batterica osservata, unendo anche i dati anamnestici e anatomopatologici. In tutti i casi all'esame anatomopatologico erano state osservate lesioni macroscopiche ascrivibili al

PRDC e da ulteriori approfondimenti diagnostici eseguiti su richiesta del conferente, da tutti i campioni è stato individuato un microrganismo rientrante tra i comuni agenti eziologici del PRDC. Come riportato in Tabella 1 il campione 2 presenta positività per SIV H1N2; il campione 3 positività per PCV2 (8x10⁶ copie genomiche virali/g); il campione 5 positività per PPRSV e PCV2 (4,1x10⁶ copie genomiche virali/g); in questo caso è stata eseguita anche la conferma istologica a livello linfonodale che ha messo in luce un quadro di Circovirosi subclinica. Dal campione 1, presentante pleurite fibrinosa ed aree multifocali di consolidamento polmonare, è stata messa in evidenza la presenza di PRRSV, SIV H1N1, *S. suis* non tipizzabile sierologicamente da parenchima polmonare e *G. parasuis* da fibrina (PCR). Quest'ultimo reperto, unito a positività per PRRSV, PCV2 (1,5x10¹⁶ copie genomiche virali/g) e *T. pyogenes* sono stati isolati anche dal campione 4 anch'esso presentante pleurite fibrinosa e broncopolmonite catarrale-purulenta.

Correa fitz e collaboratori, riportano che il microbiota nasale, e dunque delle alte vie respiratorie, influenza lo sviluppo di malattia da G. parasuis e che il phylum Bacteroidetes (cui appartiene Bergevella) è particolarmente presente nelle prime vie aeree di suini sani (2016). Questo importante aumento in termini di numerosità, che rendono B. zoohelcum coltivabile in condizioni purezza o quasi, potrebbe essere indicativo di un importante dismicrobismo, derivante da fattori stressanti cui il suino può essere sottoposto e che ha, in concomitanza, determinato la manifestazione di sierosite da G. parasuis. Come è ormai noto, infatti, un forte squilibrio del microbiota, derivante da fattori intrinseci ed estrinseci (stressors) può essere il punto chiave per l'instaurarsi di un'infezione. Anche gli studi che hanno interessato le basse vie respiratorie, quelle oggetto dei dati da noi esposti, riportano che il phylum Bacteroitedes è tra i phyla più presenti in questo distretto in animali considerati sani (Huang et al., 2019, Siqueira et al., 2017). Le valutazioni del microbiota delle basse vie respiratorie in soggetti affetti dal PRDC, ha portato alla luce un aumento della biomassa totale contenuta nei liquidi broncoalveolari, ma una netta riduzione della diversità numerica delle specie presenti (Huang et al 2019). Tra queste le specie microbiche più abbondanti risultano essere micoplasmi ed ureaplasmi, ed al contempo si osserva una riduzione di specie considerate benefiche per il distretto considerato, come Lactococcus spp. e Lactobacillus spp. (Pirolo et al., 2021). Mentre questi studi sono condotti mediante metodiche molecolari, l'esame batteriologico eseguito nella routine diagnostica permette di coltivare soltanto alcuni dei microrganismi riscontrati (es. Bergevella), che di fronte ad una riduzione di competitors possono prendere il sopravvento sulla restante flora microbica, crescendo in purezza all'esame colturale.

I dati di MIC ottenuti non sono stati interpretati, in quanto non sono disponibili Breakpoint (BP) riferibili a questa specie batterica né alla famiglia di appartenenza. Sebbene valutazioni anche solo parziali, visti i valori ottenuti, non sarebbero corrette in quanto non sono note resistenze intrinseche e/o inefficacia dei trattamenti in vivo, alcuni studi su altre specie animali riportano sensibilità ai β-lattamici e ai chinoloni, in linea con i profili da noi riportati (Shukla et al., 2003; Beltran et al., 2006). Arriba e collaboratori, riportano soltanto l'interpretazione del risultato ottenuto in ceppi di origine suina e non i valori di MIC osservati (2018). Ciò non permette un confronto corretto, ma solo delle considerazioni, che mettono in luce concordanza nella valutazione della elevata frequenza di sensibilità al ceftiofur, all'ampicillina e all'associazione amoxicillina-acido clavulanico e della frequente resistenza dei ceppi testati alla tulatromicina.

Basandoci sulle lesioni osservate e sull'esito dell'esame colturale, *B. zoohelcum* è stato refertato e sottoposto alla valutazione di antibiotico sensibilità mediante MIC, nonostante non si abbiano BP in medicina veterinaria, in quanto altri ceppi di *B. zoohelcum* ed una nuova specie correlata, *B. porcorum*, sono stati isolati da suini con segni clinici indicativi di malattia respiratoria (Zamora et al., 2016). Arriba e colleghi hanno inoltre valutato la presenza di

fattori di virulenza ed i profili di antibiotico-suscettibilità di alcuni ceppi di *Bergeyella*, isolati dalle cavità nasali di suini di 3-4 settimane di vita e di 1 cinghiale (2018). I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di alcuni dei fattori di virulenza valutati (resistenza al siero e alla fagocitosi, la presenza di capsula e capacità di aderire alle mucose) che uniti al profilo, non costante, di resistenze multiple ad antimicrobici, portano ad attribuire a *B. zoohelcum* e *B. porcorum* un potenziale potere patogeno (Arriba et al., 2018).

CONCLUSIONI

Ulteriori studi sono necessari per chiarire il potenziale ruolo patogeno di *B. zoohelcum* nel PRDC. Per ottenere informazioni più chiare è necessario associare all'esame batteriologico approfondimenti diagnostici come l'esame istologico e immunoistochimico e la ricerca di fattori di virulenza dei ceppi isolati.

In caso di mancata conferma del ruolo patogeno, di fronte ad abbondante crescita batterica all'esame colturale associato a lesioni macroscopiche riferibili a PRDC, *B. zoohelcum* potrebbe essere interpretato come indicatore di dismicrobismo delle basse vie aeree. Non si esclude che studi futuri sul microbiota dell'apparato respiratorio del suino mettano in luce che questo microrganismo, rientrante tra quelli coltivabili senza particolari metodiche nella routine diagnostica possa essere rappresentativo dell'esposizione dell'animale a determinati *stressors*. Questo è stato già evidenziato dalla letteratura esistente per altri microrganismi, mostrando come diversi stimoli (trattamenti antibiotici, livelli di ammoniaca ambientali, tipo ti alimentazione etc.) possano determinare la selezione della flora microbica a favore di determinati phyla e famiglie (Pirolo et al., 2021).

BIBLIOGRAFIA

- 1. Pirolo, M., Espinosa-Gongora, C., Bogaert, D., & Guardabassi, L. (2021). The porcine respiratory microbiome: recent insights and future challenges. Animal Microbiome, 3(1), 1-13.
- 2. de Arriba, M. L., Lopez-Serrano, S., Galofre-Mila, N., & Aragon, V. (2018). Characterisation of Bergevella spp. isolated from the nasal cavities of piglets. The Veterinary Journal, 234, 1-6.
- 3. Zamora, L., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J. F., & Vela, A. I. (2016). Bergeyella porcorum sp. nov., isolated from pigs. Systematic and applied microbiology, 39(3), 160-163.
- 4. Beltran, A., Bdiiwi, S., Jani, J., Recco, R. A., Go, E. E., & Zaman, M. M. (2006). A case of Bergeyella zoohelcum bacteremia after ingestion of a dish prepared with goat blood. Clinical infectious diseases, 42(6), 891-892.
- 5. Shukla, S. K., Paustian, D. L., Stockwell, P. J., Morey, R. E., Jordan, J. G., Levett, P. N., ... & Reed, K. D. (2004). Isolation of a fastidious Bergeyella species associated with cellulitis after a cat bite and a phylogenetic comparison with Bergeyella zoohelcum strains. Journal of Clinical Microbiology, 42(1), 290-293.
- 6. Huang, T., Zhang, M., Tong, X., Chen, J., Yan, G., Fang, S., & Ai, H. (2019). Microbial communities in swine lungs and their association with lung lesions. Microbial biotechnology, 12(2), 289-304.
- 7. Correa-Fiz, F., Gonçalves dos Santos, J. M., Illas, F., & Aragon, V. (2019). Antimicrobial removal on piglets promotes health and higher bacterial diversity in the nasal microbiota. Scientific reports, 9(1), 1-9.
- 8. Decostere, A., Devriese, L. A., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2002). Bergeyella (Weeksella) zoohelcum associated with respiratory disease in a cat. The Veterinary Record, 151(13), 392.
- 9. Vandamme, P., Bernardet, J. F., Segers, P., Kersters, K., & Holmes, B. (1994). New Perspectives in the Classification of the Flavobacteria: Description of Chryseobacterium gen. nov., Bergeyella gen. nov., and Empedobacter nom. rev. International journal of systematic bacteriology, 44(4), 827-831.

- 10. Bailie, W. E., Stowe, E. C., & Schmitt, A. M. (1978). Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. Journal of clinical microbiology, 7(2), 223-231.
- 11. Talan, D. A., Citron, D. M., Abrahamian, F. M., Moran, G. J., & Goldstein, E. J. (1999). Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. New England Journal of Medicine, 340(2), 85-92.
- 12. Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L. G., & Halbur, P. G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. Animal Health Research Reviews, 12(2), 133-148.
- 13. Brockmeier, S. L., Halbur, P. G., & Thacker, E. L. (2002). Porcine respiratory disease complex. Polymicrobial diseases, 231-258.
- 14. Lin, W. R., Chen, Y. S., & Liu, Y. C. (2007). Cellulitis and bacteremia caused by Bergeyella zoohelcum. Journal of the Formosan Medical Association, 106(7), 573-576.
- Montejo, M., Aguirrebengoa, K., Ugalde, J., Lopez, L., Nieto, J. A. S., & Hernández, J. L. (2001). Bergeyella zoohelcum bacteremia after a dog bite. Clinical Infectious Diseases, 33(9), 1608-1609.
- Reina, J., & Borrell, N. (1992). Leg abscess caused by Weeksella zoohelcum following a dog bite. Clinical infectious diseases. 14(5), 1162-1163.
- Siqueira, F. M., Pérez-Wohlfeil, E., Carvalho, F. M., Trelles, O., Schrank, I. S., Vasconcelos, A. T. R., & Zaha, A. (2017). Microbiome overview in swine lungs. PLoS One, 12(7), e0181503.
- 18. Sohn, K. M., Huh, K., Baek, J. Y., Kim, Y. S., Kang, C. I., Peck, K. R. & Chung, D. R. (2015). A new causative bacteria of infective endocarditis, Bergeyella cardium sp. nov. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, <u>81(3)</u>, 213-216.

CONGIUNTIVITE NEL SUINO SOSTENUTA DA MYCOPLASMA SP. 1654_15. CANDIDATA NUOVA SPECIE STRETTAMENTE CORRELATA A MYCOPLASMA HYORHINIS

SWINE CONJUNTIVITIS SUSTAINED BY MYCOPLASMA SP. 1654_15. A NOVEL SPECIE CLOSELY RELATED TO MYCOPLASMA HYORHINIS

CORNAGGIA M. ¹, MERENDA M. ¹, VIO D. ², GASTALDELLI M. ¹, CONCI V. ¹, GAGLIAZZO L. ³, BOTTINELLI M. ¹, SANDRI G. ⁴, CATANIA S. ¹

¹Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sezione Territoriale di Verona, Laboratorio di Diagnostica Clinica e Sierologia di Piano, Buttapietra (VR), Italia. ² Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Laboratorio di Patologia e Benessere della Specie Suina, Cordenons (PN), Italia ³ Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Epidemiologia Veterinaria, Legnaro (PD) Italia ⁴Soc.Ag. La Pellegrina Spa, Verona (VR), Italia

Parole chiave: congiuntivite suino, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma* sp. 1654_15 *Keywords*: swine conjunctivitis, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma* sp. 1654_15

RIASSUNTO

La congiuntivite è una patologia dal riscontro occasionale e sotto-diagnosticata nel suino. Essa può rappresentare un sintomo secondario di una patologia respiratoria o virale ovvero diretta conseguenza di eccessivi livelli di gas nocivi o di elevate quantità polvere nel capannone.

Nel 2020, una nuova specie di micoplasma denominata *Mycoplasma* sp. 1654_15, strettamente correlata a *Mycoplasma hyorhinis* è stata riscontrata in un focolaio di congiuntivite in Germania. Alla luce di questa recente segnalazione, lo scopo del nostro lavoro è stato quello di caratterizzare, tramite sequenziamento i ceppi di *Mycoplasma* spp. isolati in corso di congiuntivite in 4 aziende Italiane (A, B, C, D) e in precedenza identificati come *Mycoplasma hyorhinis* per evidenziare eventuali correlazioni con *Mycoplasma* sp. 1654_15.

Tutti gli isolati testati sono risultati positivi per *Mycoplasma* sp. 1654_15 confermando la diffusione di questo patogeno emergente anche nel nostro territorio.

Vista l'elevata prossimità genetica tra *Mycoplasma* sp. 1654_15 e *Mycoplasma hyorhinis* la loro differenziazione è attualmente possibile anche se non semplice; riteniamo opportuno aggiornare nel prossimo futuro l'offerta diagnostica al fine di fornire ai colleghi operanti nel settore un ulteriore strumento diagnostico giungere ad una corretta diagnosi.

ABSTRACT

Conjunctivitis is an uncommon finding in commercial swine herds, usually considered to be a secondary symptom of respiratory or viral systemic disease, or a result of irritation by dust or ammonia.

In 2020 in Germany a new species of *Mycoplasma*, so called *Mycoplasma* sp. 1654_15, strictly related to *Mycoplasma hyorhinis*, was isolated in an outbreak of swine conjunctivitis. We investigated cases of conjunctivitis in 4 wean-to-finish swine farms (A, B, C, D) where *Mycoplasma hyorhinis* was isolated and characterized.

A sequencing was conducted on all the isolated obtained by eye swabs and resulted positive for *Mycoplasma* sp. 1654_15, assuming that the pathogen is widspread also in Italy.

The common diagnostic tools available are not able to discern between *Mycoplasma* sp. 1654_15 and *Mycoplasma hyorhinis*. Therefore, new diagnostic tools are required to gain the correct diagnosis of swine conjunctivitis.

The inflammation of the conjunctiva represents a distress source that leads to a poor animal welfare condition, deputated to be a cause of aggressive behavior and a risk factor for diseases developing and cause of economic loss for the farm.

INTRODUZIONE

La congiuntiva è la sottile membrana mucosa che ricopre la superficie anteriore del bulbo oculare e la superficie interna delle palpebre. Batteri, virus e insulti ambientali possono innescare un processo flogistico chiamato congiuntivite. I segni clinici della congiuntivite sono caratterizzati da scolo oculare sieroso, mucoso o purulento. Edema ed emorragia della congiuntiva, accompagnati da eccessiva lacrimazione. Quest'ultima può manifestarsi anche secondariamente a ostruzione del dotto naso-lacrimale a seguito di rinite (17).

Sulla congiuntiva, si ripercuotono affezioni generali dell'organismo di vario tipo, quali malattie infettive sistemiche o setticemiche, reazioni allergiche e disturbi del metabolismo (p.e. l'ittero).

Tra gli agenti infettivi causa diretta di congiuntivite nel suino, si riscontrano numeri virus, quali: il virus della Peste Suina Classica (PSC), il virus della Peste Suina Africana (PSA), il virus della malattia di Aujeszky (PRV), il virus della rinite a corpi inclusi (PCMV), il virus dell'influenza suina (IAV) e il virus della sindrome respiratoria riproduttiva del suino (PRRS) (16.17).

La congiuntivite batterica primaria è sostenuta da *Chlamydia* spp., *Strepotoccous* spp., *Staphylococcus hycus*, *Glaesserella parasuis* (10). In alternativa, essa può rappresentare una lesione secondaria di processi batterici sistemici sostenuti ad esempio da *Escherichia coli* (17). Le cause non infettive di congiuntivite sono rappresentate da situazioni ambientali critiche (eccesso di ammoniaca ed altri gas; polvere), traumi e corpi estranei, reazioni allergiche o morsicature da parte di insetti (10,17).

I micoplasmi sono descritti quali agenti eziologici di congiuntivite in diverse specie animali, quali gatti (9), piccoli ruminanti (5,13), bovini (1,11) e uccelli (4,6).

Anche nel suino, sono descritti i casi di congiuntivite sostenuta da micoplasmi, sebbene il loro significato patologico sia ancora poco chiaro (7,10,16).

Generalmente la congiuntivite nel suino non è considerata una malattia di pesante impatto economico e di conseguenza gli approfondimenti diagnostici sono spesso limitati ad escludere gravi infezioni virali, o problematiche diffuse a tutto l'effettivo.

I micoplasmi di importanza clinica nel suino sono: *M. hyopneumoniae*, agente primario della polmonite enzootica, *M. hyosynoviae*, riscontrato nelle artriti dei soggetti in ingrasso, *M. suis*, causa di anemia e turbe riproduttive, *M. hyorhinis*, riscontrato in forme di artrosinovite e polisierosite dei soggetti in svezzamento; *M. flocculare* e *M. hyopharyngis* sono considerati commensali delle vie aeree. Tra i micoplasmi suini, *M. hyorhinis* è stato riscontrato in alcuni casi di congiuntiviti (7,16). Hennig-Pauka e coll. (10) (2020) hanno dimostrato la presenza di un nuovo micoplasma, geneticamente correlato a *M. hyorhinis* (omologia del 98.80-99.11%), attualmente candidato *Mycoplasma* sp. 1654_15 causa di congiuntivite in 3 differenti allevamenti suini in Germania.

Alla luce delle più recenti evidenze scientifiche, lo scopo del lavoro è stato quindi quello di caratterizzare i ceppi di micoplasmi precedentemente isolati da episodi di congiuntivite apparsi nel 2015, 2016 e 2020 in 4 allevamenti situati nelle regioni Friuli-Venezia Giulia e Veneto al fine di individuare eventuali differenze o analogie con il candidato *Mycoplasma* sp. 1654_15.

MATERIALI E METODI

Un totale di 4 aziende suinicole professionali ad elevata capacità sono state interessate da fenomeni di congiuntivite nell'effettivo negli anni 2015 (azienda A e B), 2016 (azienda C) e 2020 (azienda D). Le aziende erano localizzate nelle provincie di Padova, Verona e Pordenone. L'allevamento A consisteva in un Sito 1 + 2 (2600 scrofe più svezzamento di quasi tutti i suinetti; circa 6.000/mese) le restanti aziende erano dei siti di ingrasso (sito 3). Una visita clinica su un numero rappresentativo di animali è stata condotta dal Veterinario aziendale secondo buona prassi suiatrica. I segni clinici osservati erano caratterizzati da una congiuntivite bilaterale con edema e rossore della palpebra associata a rinite. Occasionalmente si osservava anche polmonite.

È stato formulato un quesito diagnostico di congiuntivite da *Mycoplasma* spp. e sono stati selezionati gli animali all'inizio della sintomatologia acuta, non trattati e rappresentativi del problema per un campionamento mirato al fine di procedere ad approfondimenti diagnostici. Nell'azienda A sono stati campionati un totale di sei animali, per i quali sono stati prelevati tamponi di congiuntiva, tamponi nasali e tamponi da parenchima polmonare. Nell'azienda B sono stati campionati un totale di otto tamponi di congiuntiva. Nell'azienda C sono stati prelevati tre tamponi nasali e uno di congiuntiva, nell'azienda D quattro tamponi ottenuti da congiuntiva.

I campioni sono stati consegnati al Laboratorio di Medicina Aviare afferente alla Struttura Complessa Territoriale 1 Verona e Vicenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) per essere sottoposti ad isolamento e successiva tipizzazione di *Mycoplasma* spp.

L'isolamento è stato condotto secondo procedura interna sviluppata in base a quanto prescritto dal Manuale diagnostico della World Organization for Animal Health (WOAH; Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022 capitolo 3.3.5.e capitolo 3.4.8.). Ciascun tampone è stato stemperato in Mycoplasma Liquid Medium (Mycoplasma Experience Ltd, Bletchingley, UK) e FRIIS Liquid Medium (Centro Servizi Produzione, IZSVe, Padova, Italia). I brodi sono stati poi incubati a 37+/-1°C in termostato in atmosfera modificata con aggiunta del 5% di CO₂.

I brodi sono stati ispezionati ogni giorno per la ricerca di eventuale viraggio o intorbidimento della soluzione, indice di crescita microbiologica. I campioni sono stati considerati negativi dopo un'incubazione di 21 giorni senza il viraggio del brodo.

La crescita dei microrganismi è stata considerata di interesse quando è stata osservata una variazione colorimetrica del terreno di coltura, accompagnata da scarso o lieve intorbidimento del terreno. I campioni di interesse sono stati seminati in Mycoplasma Experience agar e Friis Agar per la valutazione macroscopica delle colonie e per il test della digitonina e nisina.

Le colonie di batteri appartenenti alla classe dei *Mollicutes* risultate sensibili alla digitonina e resistenti alla nisina sono state identificate come *Mycoplasma* spp. e sottoposte a identificazione molecolare.

La differenziazione delle diverse specie di *Mycoplasma* è stata effettuata mediante cicli di amplificazione della regione variabile del gene V3 nel DNA ribosomiale 16S (rDNA) (15). Il prodotto genico di reazione di ciascun campione è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gradiente denaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - DGGE) (12).

I campioni risultati postivi per *Mycoplasma hyorhinis* sono stati sottoposti ad amplificazione del segmento U1 – U5 degli operoni *rrnA* e *rrnB* del gene *16s* rRNA, sottoposto successivamente a sequenziamento al fine di procedere con l'identificazione a livello di genere e/o specie (14).

I campioni di *Mycoplasma hyorhinis* isolati dalla congiuntiva sono stati analizzati mediante un protocollo di PCR proposto da Hennig-Pauka e coll. (2020) per *Mycoplasma* sp. 1654–15 (10).

RISULTATI

L'isolamento di *Mollicutes* appartenenti al genere *Mycoplasma* ha dato esito positivo in tutte le aziende (A-D) e la DGGE è stata condotta su tutti i ceppi isolati.

Nello specifico, dall'azienda A *Mycoplasma hyorhinis* è stato riscontrato nel soggetto 1 (cavità nasale e polmone), nel soggetto 2 (congiuntiva), nel soggetto 3 (cavità nasale), nel soggetto 4 (cavità nasale e polmone) e nel soggetto 6 (cavità nasale e congiuntiva).

Nell'azienda B, *Mycoplasma flocculare* è stato riscontrato nelle cavità nasali del soggetto 1, mentre *Mycoplasma hyorhinis* dalla congiuntiva del soggetto 2 e dal naso dei soggetti 3 e 5. *Mycoplasma hyorhinis* è stato isolato dalla congiuntiva del soggetto 8 nell'azienda C e dal soggetto 4 dell'azienda D.

Il sequenziamento dei ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* isolati da congiuntiva nelle aziende A-D ha permesso di evidenziare un'omologia tra il 99.33 e il 99.91% per *Mycoplasma* sp. 1654 15.

Tutti i ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* isolati da congiuntiva nelle aziende A-D sono risultati positivi alla PCR per *Mycoplasma* sp. 1654 15.

DISCUSSIONE

Nel settore suinicolo alcune specie di micoplasmi svolgono un ruolo patologico noto ed importante. Essi sono causa di notevoli perdite economiche derivanti dal mancato accrescimento e dalla predisposizione allo sviluppo di forme batteriche secondarie di polmonite, riassumibili nel complesso della malattia respiratoria del suino (*Porcine respiratory disease complex-PRDC*) (17).

I micoplasmi sono inoltre causa di setticemie, artrosinoviti e turbe riproduttive con conseguente aumento della mortalità e consumo di farmaco (16,17).

Sebbene la congiuntivite rappresenti un problema marginale dell'allevamento suino; essa rappresenta una fonte di stress per gli animali, che porta inevitabilmente ad una riduzione delle condizioni di benessere animale, con conseguenze severe sull'incremento ponderale e con ripercussioni negative su comportamenti aggressivi quali la morsicatura della coda, dei capezzoli e delle orecchie (2).

La congiuntivite può rappresentare un campanello di allarme della presenza di livelli elevati di gas nocivi nei locali di stabulazione (NH₃>20 ppm) che può manifestarsi come rossore delle congiuntive associato a lacrimazione eccessiva (2) ovvero manifestazione di gravi malattie sistemiche; risulta quindi essenziale un'accurata valutazione dei fenomeni clinici di irritazione della congiuntiva da parte del Medico Veterinario.

Sebbene gli episodi di congiuntivite da *Mycoplasma hyorhinis* siano saltuariamente riportati, la possibilità che esso possa rappresentare un problema è noto da tempo (8). La congiuntivite da micoplasma è inoltre riportata sia negli Stati Uniti (16) che in Germania (10). L'isolamento di *Mycoplasma* in episodi di congiuntivite in aziende localizzate sul suolo italiano conferma la circolazione del patogeno nel nostro territorio.

Mycoplasma sp. 1654_15 risulta essere particolarmente correlato a *Mycoplasma hyorhinis* con il quale condivide un'omologia genetica del 98.80-99.11% (10) e ciò è confermato anche dai dati del nostro sequenziamento.

Hennig-Pauka e coll. ipotizzano che *Mycoplasma* sp. 1654_15 sia originato da *Mycoplasma hyorhinis* attorno al 2005 (10) e i risultati di questo studio supporta tale ipotesi in quanto il primo riscontro in Italia risale al 2015.

Allo stato attuale presso i nostri laboratori, la diagnosi di tale nuovo micoplasma prevede l'isolamento ed il successivo sequenziamento, in futuro al fine di rendere più rapido lo screening potrebbe essere necessario mettere a punto una nuova RT-PCR per *Mycoplasma* sp. 1654 15 come proposto da Hennig-Pauka e coll. (10).

CONCLUSIONI

La congiuntivite rappresenta una problematica minore nell'allevamento suino, tuttavia essa può essere una manifestazione di distress degli animali e di non ottimali condizioni di benessere; questa patologia risulta spesso sotto-diagnosticata e pertanto, ad oggi, non è possibile stimare una prevalenza della patologia nella popolazione suina italiana.

Il campione diagnostico idoneo risulta essere il tampone congiuntivale prelevato in condizioni di sterilità da animali all'inizio della sintomatologia clinica, non trattati e rappresentativi del problema; in alternativa, al fine di una valutazione anatomopatologica ed istopatologica la carcassa o parte di essa è ritenuta un campione altrettanto valido.

L'isolamento di *Mycoplasma* sp. 1654_15 in corso di congiuntivite necessita di ulteriori approfondimenti diagnostici al fine di chiarire l'eventuale ruolo patogeno di questo nuovo micoplasma. Inoltre, vista la capacità dei micoplasmi di evolvere e adattarsi con notevole rapidità (3) è sempre bene mantenere alta l'attenzione in particolare in un settore zootecnico ad alta specializzazione come quello del suino. Tutto ciò al fine di ridurre per quanto possibile il rischio di riarrangiamenti o l'occupazione di nuove nicchie ecologiche da parte di questi microrganismi, la cui linea evolutiva si caratterizza per la rapida capacità di adattamento.

In futuro, si prevede la necessità che i laboratori diagnostici si adoperino per fornire, ai medici veterinari operanti nel settore, strumenti diagnostici utili ad evidenziare il *Mycoplasma* sp. 1654–15, al fine di mantenere la dovuta attenzione per questa *new entry* nel settore suinicolo.

BIBLIOGRAFIA

- Alberti A., Addis M.F., Chessa B., Cubeddu T., Profiti M., Rosati S., Ruiu A., Pittau M. (2006) Molecular and antigenic characterization of a Mycoplasma bovis strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 18(1):41-51.
- Alborali Giovanni Loris, Maisano Antonio Marco, Santucci Giovanni, Scali Federico, Bertocchi Luigi. (2019) Benessere Animale: Linee Guida per la Categorizzazione del Rischio Nell'allevamento Suino Dallo Svezzamento All'ingrasso Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini" Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale Ministero della Salute: 1-143
- 3. Ciccarelli F.D., Doerks T., Von Mering C., Creevey C.J., Snel B., Bork P. (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. Science 311(5765):1283-1287.
- 4. Dhondt A.A., DeCoste J.C., Ley D.H., Hochachka W.M. (2014) Diverse wild bird host range of Mycoplasma gallisepticum in eastern North America. PLoS One 9(7):e103553.
- 5. Fernández-Aguilar X., Cabezón Ó, Marco I., Mentaberre G., Frey J., Lavín S., López-Olvera J.R. (2013) Mycoplasma conjunctivae in domestic small ruminants from high mountain habitats in Northern Spain. BMC veterinary research 9(1):1-5.
- 6. Forsyth M.H., Tully J.G., Gorton T.S., Hinckley L., Frasca Jr S., Van Kruiningen H.J., Geary S.J. (1996) Mycoplasma sturni sp. nov., from the conjunctiva of a European starling (Sturnus vulgaris). Int.J.Syst.Bacteriol. 46(3):716-719.
- 7. Friis N.F. (1976) A serologic variant of Mycoplasma hyorhinis recovered from the conjunctiva of swine. Acta Vet.Scand. 17(3):343-353.
- 8. Friis N.F. (1976) A serologic variant of Mycoplasma hyorhinis recovered from the conjunctiva of swine. Acta Vet.Scand. 17(3):343-353.
- 9. Haesebrouck F., Devriese L.A., Van Rijssen B., Cox E. (1991) Incidence and significane of isolation of Mycoplasma felis from conjunctival swabs of cats. Vet.Microbiol. 26(1-2):95-101.
- Hennig-Pauka I., Sudendey C., Kleinschmidt S., Ruppitsch W., Loncaric I., Spergser J. (2020) Swine conjunctivitis associated with a novel mycoplasma species closely related to Mycoplasma hyorhinis. Pathogens 10(1):13.

- 11. Langford E.V., Leach R.H. (1973) Characterization of a mycoplasma isolated from infectious bovine keratoconjunctivitis: M. bovoculi sp. nov. Can.J.Microbiol. 19(11):1435-1444.
- McAuliffe L., Ellis R.J., Lawes J.R., Ayling R.D., Nicholas R.A. (2005) 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species. J.Med.Microbiol. 54(8):731-739.
- 13. Motha M., Frey J., Hansen M.F., Jamaludin R., Tham K.M. (2003) Detection of Mycoplasma conjunctivae in sheep affected with conjunctivitis and infectious keratoconjunctivitis. N.Z.Vet.J. 51(4):186-190.
- 14. Pettersson B., Leitner T., Ronaghi M., Bölske G., Uhlen M., Johansson K. (1996) Phylogeny of the Mycoplasma mycoides cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. J.Bacteriol. 178(14):4131-4142.
- 15. Poveda J.B., Nicholas R., Miles R., Nicholas R. (1998) Methods in Molecular Biology, Vol. 104, Mycoplasma Protocols.
- 16. Resende T.P., Pieters M., Vannucci F.A. (2019) Swine conjunctivitis outbreaks associated with Mycoplasma hyorhinis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 31(5):766-769.
- 17. Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Stevenson G.W., Schwartz K.J. (2012) Diseases of swine. John Wiley & Sons,

EFFICIENZA DELLA LATTAZIONE E SALUTE DEL SUINETTO POST-SVEZZAMENTO TRAMITE SUPPLEMENTO DI CELLULE INTEGRE DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE INATTIVATE E STABILIZZATE NELLA DIETA DELLA SCROFA IN GESTAZIONE

LACTATION EFFICIENCY AND POST-WEANING PIGLETS' HEALTH AFTER THE ADMINISTRATION OF WHOLE INACTIVATED AND STABILIZED CELLS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE TO GESTATING SOWS

BORELLO I.1, GHILARDI M.2, SCOLLO A.1

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO); ²Dox-al Italia S.p.A., Sulbiate (MB)

Parole chiave: *Saccharomyces cerevisiae*, efficienza di lattazione, riduzione dell'antibiotico, salute post-svezzamento.

Keywords: Saccharomyces cerevisiae, lactation efficiency, antibiotic use reduction, post-weaning health.

RIASSUNTO

Scrofe sempre più iper-prolifiche e la richiesta di ridurre gli antibiotici rappresentano delle sfide nell'allevamento suinicolo. Scopo di questo lavoro è stato determinare gli effetti di un prodotto ottenuto da cellule integre di Saccharomyces cerevisiae inattivate e stabilizzate, somministrato durante l'intera gestazione della scrofa, sulle performance di madre e nidiata. Sono stati valutati i consumi alimentari della madre, e la salute del suinetto post svezzamento, incluso il consumo degli antibiotici. Sono state coinvolte 183 scrofe, suddivise subito dopo la fecondazione in: (1) scrofe alimentate con mangime gestazione e 50 ml giornalieri di cellule integre di Saccharomyces cerevisiae inattivate e stabilizzate (PROVA, n=90); (2) scrofe senza supplemento (CONTROLLO, n=93). I suinetti sono stati seguiti in due differenti siti postsvezzamento. L'efficienza della lattazione delle scrofe PROVA è migliorata, con una resa alimentare di quasi sei punti percentuali più alta (41,3 vs 35,4%, P-value = 0,011). Inoltre, in entrambi gli svezzamenti, si è registrato un miglioramento della mortalità e del consumo dell'antibiotico. I risultati ottenuti suggeriscono la possibile capacità delle cellule integre di Saccharomyces cerevisiae inattivate e stabilizzate di modulare il sistema immunitario del suinetto. Inoltre, l'aumento dell'efficienza alimentare durante la lattazione si conferma un parametro interessante per valutare la sostenibilità dell'allevamento anche dal punto di vista economico. I risultati sono incoraggianti considerando l'aumento del costo delle materie prime, la richiesta di animali sempre più performanti, e la necessità di diminuire il consumo dell'antibiotico.

ABSTRACT

Increasingly hyper prolific sows and the demand to reduce antibiotics represent challenges in pig farming. The aim of this work was to determine the effects of a product obtained from whole inactivated and stabilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*, administered during the entire gestation of the sow, on the performance of the mother and litter. Maternal feed consumption and post-weaning piglet health were assessed, including antibiotic consumption. N. 183 sows were involved, divided immediately after breeding into: (1) sows fed with gestation feed and 50 ml of whole inactivated and stabilized cells of *Saccharomyces*

cerevisiae per day (PROVA, n=90); (2) sows without supplement (CONTROL, n=93). Piglets were followed up at two different post-weaning sites. The lactation efficiency of the PROVA sows improved, with a feed conversion rate six percentage points higher (41.3 vs 35.4%, P-value = 0.011). Furthermore, in both weanings, there was an improvement in mortality and antibiotic consumption. The results obtained suggest the possible ability of the whole inactivated and stabilized *Saccharomyces cerevisiae* cells to modulate the piglet's immune system. Furthermore, the increase in feed efficiency during lactation is confirmed as an interesting parameter for assessing the sustainability of farming also from an economic point of view. The results are encouraging considering the increase in the cost of raw materials, the demand for increasingly performing animals, and the need to decrease the consumption of the antibiotics.

INTRODUZIONE

La selezione genetica ha portato alla produzione di scrofe sempre più iper prolifiche, aumentando la necessità di nutrienti durante la gestazione e la lattazione per permettere concomitantemente anche un aumento della produzione di latte per supportare la crescita della nidiata (MLC, 2006). Un limitato apporto nutrizionale può portare le scrofe ad un severo stato catabolico e a conseguenti performance riproduttive ridotte (Kim and Easter, 2003; Sulabo et al., 2010). Ecco perché le strategie nutrizionali per migliorare la produzione e l'eiezione del latte hanno acquisito particolare importanza negli ultimi tempi, considerando che migliorare le performance della nidiata equivale anche ad una maggiore sostenibilità economica della scrofaia. Inoltre, è aumentata negli ultimi anni anche la necessità di svezzare animali più "pronti e maturi" dal punto di vista digestivo, in quanto l'abolizione dell'utilizzo dello Zinco ossido e la richiesta di ridurre gli antibiotici nel settore zootecnico rappresentano certamente delle sfide nell'allevamento suinicolo. Aumento della prolificità e capacità digestive ottimali spesso sono difficili da raggiungere contemporaneamente, in quanto nidiate numerose richiedono spesso un management che non sempre mette al primo posto la "maturità" del suinetto (es. svezzamenti precoci o baliaggi precocissimi). I probiotici ed i prebiotici hanno attirato per questo motivo l'attenzione, e studi approfonditi sono già stati condotti per investigare i loro effetti benefici sulle performance e la salute degli animali (Braat et al., 2004; van der Peet- Schwering et al., 2007; Schierack et al., 2009). I prodotti ottenuti dalla lavorazione di Saccharomyces cerevisiae sono stati utilizzati da diversi autori per migliorare l'utilizzo e la digeribilità dei nutrienti, così come per aumentare la produzione di latte nei ruminanti (Cole et al., 1992; McCoy et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Robinson and Garrett, 1999). Nel settore suinicolo, diverse ricerche hanno confermato come un supplemento alimentare a base di questi prodotti può migliorare le performance di crescita, la produzione di latte, il bilancio azotato, la digestione dei nutrienti e le performance riproduttive (Kornegay et al., 1995; van der Peet-Schwering et al., 2007; Kim et al., 2008 and 2010; Shen et al., 2009). Tuttavia, non sono numerose le prove condotte sulle scrofe, e sugli effetti che l'alimentazione della madre durante la gestazione può avere sulla nidiata fino al post-svezzamento. Scopo di questo lavoro è determinare gli effetti di un prodotto innovativo ottenuto da cellule integre di Saccharomyces cerevisiae inattivate e stabilizzate non ancora investigato, somministrato durante l'intera gestazione della scrofa, sulle performance produttive di madre e nidiata durante la lattazione, includendo i consumi alimentari della madre durante l'intero ciclo produttivo e la salute del suinetto post svezzamento, con particolare riferimento anche al consumo dei farmaci antibiotici.

MATERIALI E METODI

Sono state coinvolte nella prova 183 scrofe (di primo e secondo parto, Danish Genetics),

suddivise in due gruppi sperimentali subito dopo la fecondazione: (1) scrofe alimentate con mangime gestazione additivato con 50 ml giornalieri di cellule integre di Saccharomyces cerevisiae inattivate e stabilizzate (EUBRIOTIC® SOW, Dox-al) per l'intera durata della gestazione (PROVA, n=90); (2) scrofe alimentate senza supplemento (CONTROLLO, n=93). Durante la gestazione, le scrofe sono state accasate in box di gruppo liberi che contenevano la totalità delle scrofe di ciascun gruppo sperimentale: il box PROVA sulla destra ed il box CONTROLLO sulla sinistra, entrambi nella stessa stanza. Ciascun gruppo sperimentale aveva a disposizione una macchina alimentatrice individuale, che distribuiva l'esatto quantitativo di alimento a ciascuna scrofa grazie alla lettura di un microchip individuale sull'orecchio dell'animale. Nel gruppo PROVA, il prodotto supplementare era distribuito tramite una pompa automatica che lo versava direttamente sul pasto al momento della distribuzione individuale. La stabulazione degli animali osservava la densità di legge, e della paglia sminuzzata era messa a disposizione degli animali sul pavimento quotidianamente come arricchimento ambientale. Al giorno 109 di gestazione, le scrofe sono state spostate nelle stanze parto individuali, con metratura di 7,2 m² (di cui 1,3 m² di nido riservato ai suinetti), dove sono state confinate in gabbia soltanto nei primi tre giorni dopo il parto. I suinetti sono stati svezzati mediamente a 28 giorni di vita.

L'ingestione volontaria delle scrofe è stata registrata individualmente sia durante la gestazione che durante la lattazione. Al parto, sono stati registrati il numero di nati vivi ed il peso totale della nidiata. Qualunque operazione di baliaggio è stata ridotta al minimo indispensabile per la sopravvivenza dei suinetti, e comunque vietata se non entro lo stesso gruppo sperimentale. Inoltre, il giorno del parto è stata valutata la qualità del colostro di ciascuna scrofa tramite l'utilizzo di un rifrattometro Brix che ha stimato la concentrazione delle IgG (Quigley et al., 2013). Durante la lattazione, sono stati registrati gli episodi di mortalità dei suinetti, il consumo di antibiotico, e l'eventuale clinica enterica tramite uno score fecale da 0 (assenza di diarrea) a 2 (presenza di almeno una scarica enterica di consistenza liquida). Al momento dello svezzamento, le nidiate sono state nuovamente pesate. I suinetti svezzati sono stati spostati in due differenti siti di svezzamento: svezzamento (1) 883 suinetti sono stati alloggiati in 4 box (due di PROVA = 499 suinetti; due di CONTROLLO = 384) con pavimento grigliato, nidi coperti con riscaldamento a pavimento, alimentazione a secco e paglia nelle rastrelliere come arricchimento ambientale; svezzamento (2) 1119 suinetti sono stati alloggiati in 8 box (quattro di PROVA = 560 suinetti; quattro di CONTROLLO = 559) con pavimento pieno, alimentazione a secco e tronchetti di legno come arricchimento ambientale. Nello svezzamento 1, gli animali sono stati monitorati per 57 giorni di permanenza nella stalla, con una pesata iniziale di gruppo ed una pesata finale. Durante questo arco di tempo, è stato monitorato il consumo dei farmaci di ciascun gruppo e la mortalità. Nello svezzamento 2, gli animali sono stati monitorati per 14 giorni, durante i quali è stata raccolta l'ingestione di alimento, la mortalità ed il consumo di antibiotico.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati test non parametrici dove la scrofa o la nidiata erano l'unità sperimentale. Considerando che per alcune scrofe, immediatamente dopo l'accasamento nei gruppi gestazione, non si sono registrati accessi alle macchine di distribuzione dell'alimento per alcuni pasti per motivi individuali legati alla mancata abitudine nell'utilizzo della postazione e non alla prova sperimentale, l'analisi dei consumi ha preso in considerazione solamente i pasti successivi all'inizio dell'utilizzo della macchina. Il dato è stato espresso come percentuale di differenza tra il consumo reale registrato, ed il consumo atteso (secondo una curva di alimentazione standard da gestazione) nei pasti considerati. La resa alimentare durante la lattazione è stata calcolata tramite il rapporto percentuale tra i kg di incremento ponderale della nidiata e l'ingestione

di alimento della scrofa. I dati espressi come frequenza sono stati invece valutati con il test del chi quadro. Valori di probabilità inferiori a 0,05 sono stati utilizzati come criterio di significatività statistica, mentre valori inferiori a 0,10 sono stati considerati una tendenza. Per i dati relativi ai due svezzamenti, avendo a disposizione soltanto delle medie di gruppo, è stata svolta una semplice statistica descrittiva, ed una stima economica dei risultati. Il consumo dei farmaci è stato espresso come costo/capo (comprensivo di antibiotici ed altri farmaci), e come DDDita (unità di misura per la quantificazione dell'utilizzo dei soli antibiotici; Tarakdjan et al., 2020).

RISULTATI

I consumi di alimento durante la gestazione delle scrofe nei due gruppi non hanno mostrato differenze significative. La percentuale di ingestione è stata per entrambi i gruppi molto vicina alla curva standard prestabilita per questa fase produttiva (+0,06%). Tuttavia, le scrofe del gruppo PROVA hanno ingerito una quantità inferiore di alimento durante la permanenza di sala parto ($166,4\pm35,3$ vs $181,3\pm34,9$ kg/capo; P-value = 0,019). Le performances della nidiata alla nascita non hanno mostrato differenze tra i gruppi sperimentali, fatto salvo una tendenza statistica a favore del gruppo PROVA concernente il peso medio dei suinetti alla nascita ($1,39\pm0,3$ vs $1,32\pm0,4$ kg; P-value = 0,087). Significativa invece la resa alimentare ottenuta dal gruppo PROVA durante la lattazione (+5,9 %, tabella 1). L'utilizzo dell'antibiotico nei suinetti in lattazione è stato minimo e simile in entrambi i gruppi sperimentali.

	PROVA		CONTROLLO		
Variabile	Media	Deviazione standard	Media	Deviazione standard	P-value
N° suinetti nati vivi	15,256	1,386	15,512	1,289	ns
Peso nidiata alla nascita, kg	21,002	4,506	20,190	4,839	ns
Peso medio alla nascita, kg	1,386	0,318	1,316	0,365	0,089
Brix (%)	20,276	5,773	20,911	4,933	ns
N° suinetti Svezzati	11,378	2,547	11,012	2,317	ns
Peso nidiata allo svezzamento, kg	74,927	20,530	71,878	19,535	ns
Peso medio allo svezzamento, kg	6,630	1,294	6,610	1,497	ns
Score fecale (controllo 1)	1,354	0,565	1,267	0,495	ns
Score fecale (controllo 2)	1,104	0,425	1,022	0,147	ns
Score fecale (controllo 3)	1,063	0,433	1,087	0,463	ns
Incremento ponderale medio suinetto in lattazione, kg	5,243	1,242	5,293	1,460	ns
Incremento ponderale medio nidiata in lattazione, kg	53,924	19,960	51,688	19,984	ns
Resa alimentare lattazione, %	41,3	11,4	35,4	11,6	0,011

Tabella 1. Dati produttivi dei due gruppi sperimentali durante la fase di lattazione. *Table 1. Productive data from the two experimental groups during the lactation phase.*

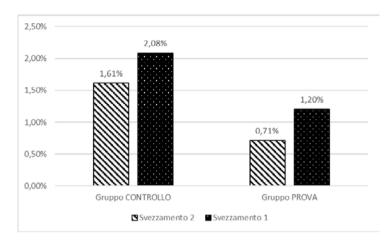


Figura 1. Mortalità percentuale dei suinetti nei due svezzamenti rispettivamente nel gruppo CONTROLLO e nel gruppo PROVA.

Figure 1. Percentage of mortality of the piglets from both the weaning sites involved in the study, for CONTROLLO and PROVA groups.

I suinetti in ingresso nello svezzamento 1 pesavano 8,32 e 7,81 rispettivamente per il gruppo CONTROLLO ed il gruppo PROVA, mentre dopo 57 giorni di permanenza il loro peso medio era di 41,0 e 43,1 kg rispettivamente. Durante questo periodo, il gruppo PROVA ha consumato meno farmaco del gruppo CONTROLLO. La spesa/capo è stata di 0,054 € e 0,0784 €, rispettivamente, mentre le DDDita consumate sono state di 0,72 vs 1,22. La mortalità registrata è stata di 1,2% per il gruppo PROVA e 2,08% per il gruppo CONTROLLO (figura 1). Considerando i dati economici a disposizione (kg prodotti, mortalità e consumo di farmaco, e costo giornaliero stalla stimato di 0,10 €/capo), il costo di un kg di carne per il gruppo PROVA è stato -0,10 € rispetto al gruppo CONTROLLO (1,50 € vs 1,6 €), con una differenza di 3255,1 € calcolati sull'intera partita di animali (PROVA + CONTROLLO, 869 suini venduti). Nello svezzamento 2, i suinetti del gruppo PROVA hanno ingerito giornalmente 221 gr/capo nei primi 14 giorni di permanenza nella stalla, contro i 208 gr/capo del gruppo CONTROLLO. La mortalità è stata di 0,71% vs 1,61%, rispettivamente (figura 1). La spesa/capo è stata di 0,178 € e 0,221 €, rispettivamente per il gruppo PROVA e quello CONTROLLO, mentre le DDDita consumate sono state di 2,35 vs 2,12.

DISCUSSIONE

Alcune caratteristiche dei prodotti a base di lieviti sono state già evidenziate da diversi studi più o meno recenti, che ne hanno confermato l'abilità di promuovere la crescita e le proprietà potenziali di ridurre l'utilizzo degli antibiotici (Price et al., 2010; van heugten et al. 2003; van der Peet-Schwering et al., 2007; Shen et al., 2009) nel suino. Nel presente studio, è stato utilizzato un prodotto ottenuto tramite una tecnologia che consente alle cellule di *Saccharomyces cerevisiae di* rimanere integre, preservando aspetto morfologico e patrimonio cellulare propri della cellula viva. Il processo di inattivazione consisteva nel bloccare l'attività biologica nella fase di moltiplicazione riproduttiva mediante un trattamento chimico-fisico brevettato. Le cellule sono state poi stabilizzate grazie a un trattamento con specifici agenti, che hanno assicurato che l'inibizione dell'attività biologica fosse mantenuta nel lungo periodo e allo stesso tempo si conservasse inalterata l'integrità originale della cellula. Il processo era stato sviluppato con l'intento di mantenere i vantaggi

della cellula viva ma senza creare antagonismo nell'organismo e senza sottrarre nutrienti. Alcuni autori hanno attribuito la capacità dei prodotti a base di lievito di apportare dei benefits dell'allevamento grazie alla predisposizione verso un'ingestione alimentare maggiore (Veum et al., 1973; Shen et al., 2009), aumentando l'ingestione media giornaliera (van der Peet-Schwering et al., 2007; Shen et al., 2009), e migliorando l'efficienza alimentare dei suini (van der Peet-Schwering et al., 2007). Studi condotti utilizzando prodotti di fermentazione ottenuti da Saccharomyces cerevisiae e somministrati alle scrofe durante la gestazione e la lattazione. hanno evidenziato che a trarne beneficio è l'aumento di peso della nidiata durante la lattazione (Kim et al., 2008, 2010; Shen et al., 2011). Nel presente studio, l'incremento di peso dei suinetti e della nidiata durante la lattazione non ha mostrato differenze tra i due gruppi di osservazione, mentre si è registrata una tendenza ad avere maggior peso medio alla nascita nel gruppo trattato. Una possibile spiegazione a questo risultato, oltre alla diversa natura del prodotto stesso, può emergere anche dall'analisi della durata della somministrazione del prodotto, che negli altri studi è stato somministrato anche durante la lattazione. Una conferma che la durata della somministrazione è verosimilmente un fattore discriminante all'ottenimento di migliori risultati produttivi è data da quanto riportato da Veum et al. (1995), che non riscontrarono nessun miglioramento legato al peso dei suinetti ed al suo incremento, ma somministrarono il prodotto a partire dai 60 giorni di gestazione fino allo svezzamento. Tuttavia, nel presente studio si è deciso di adottare tra i parametri di valutazione anche la resa alimentare della lattazione, che è risultata essere estremamente vantaggiosa nel gruppo delle scrofe trattate. Questo parametro è stato preso in considerazione la prima volta da Bergsma et al. (2009), che descrive le dinamiche della composizione corporea delle scrofe e dei suinetti durante la lattazione, e introduce il nuovo concetto chiamato "efficienza della lattazione". Infatti, la produttività delle scrofe è cresciuta enormemente negli ultimi anni, soprattutto nell'ultimo decennio. Le scrofe sono state cambiate dal punto di vista genetico per produrre nidiate più numerose. Nei Paesi Bassi per esempio, il numero di suinetti svezzato per scrofa aumenta ogni anno, passando da 23 suinetti nel 2001 a 25,8 nel 2007 (Kengetallenspiegel, 2002, 2008). La mortalità dei suinetti durante la lattazione negli stessi anni è cresciuta dall'11.8% al 12.8%. È normale immaginare come, per supportare nidiate così numerose, è importante mantenere le scrofe in una buona condizione fisica. L'ingestione alimentare delle scrofe durante la lattazione spesso non è sufficiente per sostenere la produzione di latte necessaria per queste nidiate (Noblet et al., 1998; Eissen, 2000). Purtroppo, se la richiesta energetica maggiore non può essere sostenuta da un aumento dell'ingestione alimentare, le scrofe mobilitano energia dalle proprie riserve corporee. Questo non è un problema se la mobilizzazione è contenuta, mentre diventa problematico se è eccessiva, sfociando anche in problemi di fertilità al ciclo riproduttivo successivo (Whittemore and Morgan, 1990; Clowes et al., 2003). Una migliore efficienza alimentare durante la lattazione potrebbe essere una soluzione: più latte prodotto con la stessa quantità di alimento ingerito e la stessa mobilizzazione delle riserve corporee. I risultati ottenuti dal presente studio confermano quanto era già stato suggerito nel 2009 da Bergsma et al.: le differenze dell'efficienza della lattazione tra diverse scrofe esiste, e può essere influenzata. Le scrofe del gruppo PROVA hanno migliorato la loro resa alimentare di quasi sei punti percentuali. Si è abituati a considerare la resa alimentare soltanto nella fase di accrescimento del suino dove, facendo un esempio su un animale di 25 kg, il 33% del costo del suinetto è relativo all'alimento (Den Ouden et al., 1997). L'aumento dell'efficienza alimentare durante la lattazione e altrettanto rilevante, ed un incremento del 10% riduce la quantità di alimento necessaria per scrofa/anno di circa 40 kg (calcolo ipotizzato da Bergsma et al., 2009). A supporto dei dati ottenuti durante la lattazione, anche i dati dello svezzamento sembrano essere incoraggianti. In entrambi i siti di svezzamento, ognuno per la durata e per le caratteristiche del sito, si è registrato un miglioramento della mortalità e del consumo

dell'antibiotico. Per quanto purtroppo non sia possibile completare il quadro con un'analisi statistica, i dati sembrano supportare risultati già discussi in letteratura riguardo la capacità di prodotti a base di Saccharomyces cerevisiae di modulare il sistema immunitario. Per esempio, Bergsma et al. (2009) riportano una ridotta quantità di granulociti neutrofili nel sangue della scrofa a 110 giorni di gestazione e 21 di lattazione, i meno globuli bianchi a 110 giorni di gestazione. risultati simili sono stati evidenziati da altri autori che hanno investigato l'azione dei lieviti sul sistema immunitario e sulla salute animale (Muchmore et al., 1990; Podzorski et al., 1990; Price et al., 2010; White et al., 2002; Shen et al., 2009). L'aumento della conta neutrofilica può indicare una condizione infiammatoria, in quanto i granulociti neutrofili rappresentano una prima linea di difesa associata ad infezione clinica e subclinica (Roth, 1999). Questa ridotta condizioni infiammatoria potrebbe addirittura essere legata al miglioramento della salute intestinale, come dimostrato da Shen et al. (2009b), che ha riportato come la citochina IFN-γ fosse aumentata nella mucosa intestinale a seguito di supplementazione alimentare di lieviti, una fagocitosi efficiente dei batteri da parte dei macrofagi attivati da questa citochina può prevenire la migrazione dei batteri patogeni attraverso la mucosa (Kaiserlian et al., 2005), riducendo quindi anche la conta neutrofili e dei globuli bianchi. Questo meccanismo potrebbe essere alla base anche della minore necessità di utilizzare degli antibiotici nel presente studio, o alla base anche della mortalità inferiore registrata nel gruppo di trattamento.

Concludendo, i risultati di questo studio suggeriscono come la supplementazione alimentare di un prodotto ottenuto da cellule integre di *Saccharomyces cerevisiae* inattivate e stabilizzate durante l'intera gestazione delle scrofe può potenzialmente migliorare l'efficienza della lattazione. Sebbene siano suggeriti ulteriori studi per approfondire la resa alimentare durante lo svezzamento, i dati relativi alla mortalità e al consumo dell'antibiotico degli animali nati da scrofe così alimentate sono incoraggianti. I dati sono particolarmente importanti soprattutto nell'era della suinicoltura moderna, considerando l'aumento del costo delle materie prime, la richiesta di animali sempre più performanti, e concomitantemente la necessità di diminuire il consumo dell'antibiotico.

BIBLIOGRAFIA

- Bergsma, R., Kanis, E., Verstegen, M. W. A., van der Peet–Schwering, C. M. C., & Knol, E. F. (2009). Lactation efficiency as a result of body composition dynamics and feed intake in sows. Livestock science, 125(2-3), 208-222.
- 2. Braat, H., J. van den Brande, E. van Tol, D. Hommes, M. Peppelenbosch, and S. van Deventer. 2004. Lactobacillus rhamnosus induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. Am. J. Clin. Nutr. 80:1618–1625.
- 3. Clowes, E.J., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R., Baracos, V.E., 2003. Selective protein loss in lactating sows is associated with reduced litter growth and ovarian function. J. Anim. Sci. 81, 753–764.
- 4. Cole, N. A., C. W. Purdy, and D. P. Hutcheson. 1992. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. J. Anim. Sci. 70:1682-1690.
- 5. Den Ouden, M., Nijsing, J.T., Dijkhuizen, A.A., Huirne, R.B.M., 1997. Economic optimization of pork production-marketing chains: I. Model input on animal welfare and costs. Livest. Prod. Sci. 48, 23–37.
- 6. Eissen, J.J., 2000. Breeding for Feed Intake Capacity in Pigs. Ph D. dissertation, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 105–122.
- Kaiserlian, D., N. Cerf-Bensussan, and A. Hosmalin. 2005. The mucosal immune system: From control of inflammation to protection against infections. J. Leukoc. Biol. 78:311-318.
- 8. Kengetallenspiegel, 2002. Periode: januari 2001–december 2001. Uitgave: maart 2002.

- Bedrijfsvergelijking SivaComvee, Wageningen.
- 9. Kengetallenspiegel, 2008. Periode: januari 2005–december 2007. Uitgave: maart 2008. Bedrijfsvergelijking Agrovision, Wageningen.
- 10. Kim, S. W., and R. A. Easter. 2003. Amino acid utilization for reproduction in sows. Pages 203–222 in Amino Acids in Animal Nutrition. J. P. F. D'Mello, ed. CABI Publ., Wallingford, UK.
- 11. Kim, S. W., M. Brandherm, B. Newton, D. R. Cook, I. Yoon, and G. Fitzner. 2010. Effect of supplementing *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in sow diets on reproductive performance in a commercial environment. Can. J. Anim. Sci. 90:229–232.
- 12. Kim, S. W., M. Brandherm, M. Freeland, B. Newton, D. Cook, and I. Yoon. 2008. Effects of yeast culture supplementation to gestation and lactation diets on growth of nursing piglets. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21:1011-1014.
- 13. Kornegay, E. T., D. Rhein-Welker, M. D. Lindemann, and C. M. Wood. 1995. Performance and nutrient digestibility in weaning pigs as Influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. J. Anim. Sci. 73:1381-1389.
- 14. McCoy, G. C., J. K. Drackley, M. F. Hutjens, and J. E. Garrett. 1997. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. J. Dairy Sci. 80(Suppl.1):662.
- 15. MLC. 2006. Pig Yearbook 2006. Meat and Livestock Commission. London.
- 16. Muchmore, A. V., N. Sathyamoorthy, J. Decker, and A. P. Sherblom. 1990. Evidence that specific high-mannose oligosaccharides can directly inhibit antigen-driven T-cell responses. J. Leukoc. Biol. 48:457–464.
- 17. Noblet, J., Etienne, M., Dourmad, J.-Y., 1998. Energetic efficiency of milk production. In: Verstegen, M.W.A., Moughan, P.J., Schrama, J.W. (Eds.), The Lactating Sow. Wageningen Pers, Wageningen, pp. 113–130.
- 18. Podzorski, R. P., G. R. Gray, and R. D. Nelson. 1990. Different effects of native Candida albicans mannan and mannan-derived oligosaccharides on antigen-stimulated lymphoproliferation in vitro. J. Immunol. 144:707-716.
- 19. Price, K. L., H. R. Totty, H. B. Lee, M. D. Utt, G. E. Fitzner, I. Yoon, M. A. Ponder, and J. Escobar. 2010. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during Salmonella infection. J. Anim. Sci. 88:3896-3908.
- 20. Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., & Polo, J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. Journal of dairy science, 96(2), 1148-1155.
- 21. Robinson P. H., and J. E. Garrett. 1999. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. J. Anim. Sci. 77:988-999.
- 22. Roth, J. A. 1999. The immune system. Pages 800-801 in Diseases of Swine. 8th ed. S. D'Allaire, ed. Iowa State Univ. Press, Ames.
- 23. Sanchez, W. K.., G. D. Poppy, M. A. Guy, and J. E. Garrett. 1997. Influence of yeast on lactational performance and blood mineral concentrations of high producing dairy cows on a commercial dairy. J. Dairy Sci. 80(Suppl. 1):210.
- 24. Schierack, P., M. Filter, L. Scharek, C. Toelke, D. Taras, K. Tedin, K. Haverson, A. Lübke-Becker, and L. H. Wieler. 2009. Effects of Bacillus cereus var. toyoi on immune parameters of pregnant sows. Vet. Immunol. Immunopathol. 127:26–37.
- 25. Shen, Y. B., Carroll, J. A., Yoon, I., Mateo, R. D., & Kim, S. W. (2011). Effects of supplementing *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in sow diets on

- performance of sows and nursing piglets. Journal of animal science, 89(8), 2462-2471.
- 26. Shen, Y. B., X. S. Piao, S. W. Kim, L. Wang, P. Liu, I. Yoon, and Y. G. Zhen. 2009b. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. J. Anim. Sci. 87:2614–2624.
- 27. Sulabo, R. C., J. Y. Jacela, M. D. Tokach, S. S. Dritz, R. D. Goodband, J. M. DeRouchey, and J. L. Nelssen. 2010. Effects of lactation feed intake and creep feeding on sow and piglet performance. J. Anim. Sci. 88:3145-3153.
- 28. Tarakdjian, J., Capello, K., Pasqualin, D., Santini, A., Cunial, G., Scollo, A., ... & Di Martino, G. (2020). Antimicrobial use on Italian pig farms and its relationship with husbandry practices. Animals, 10(3), 417.
- 29. van der Peet-Schwering, C. M. C., A. J. M. Jansman, H. Smidt, and I. Yoon. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weaning pigs. J. Anim. Sci. 85:3099-3109.
- 30. van Heugten, E., D. W. Funderburke, and K. L. Dorton. 2003. Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weaning pigs fed live yeast. J. Anim. Sci. 81:1004-1012.
- 31. Veum, T. L., and G. L. Bowman. 1973. *Saccharomyces cervisiae* yeast culture in diets for mechanically-fed neonatal pigs and early growing self-fed pigs. J. Anim. Sci. 37(Suppl. 1):67.
- 32. Veum, T. L., J. Reyes, and M. Ellersieck. 1995. Effect of supplemental yeast culture in sow gestation and lactation diets on apparent nutrient digestibilities and reproductive performance through one reproductive cycle. J. Anim. Sci. 73:1741-1745.
- 33. White, L. A., M. C. Newman, G. L. Cromwell, and M. D. Lindemann. 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weaning pigs. J. Anim. Sci. 80:2619-2628.
- 34. Whittemore, C.T., Morgan, C.A., 1990. Model components for the determination of energy and protein requirements for breeding sows: a review. Livest. Prod. Sci. 1–37.

INIBIZIONE DELLA REPLICAZIONE DEL VIRUS DELLA PESTE SUINA AFRICANA DA PARTE DEL β-GLUCANO

INHIBITION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS REPLICATION BY β-GLUCAN

HA THI THANH TRAN1 † , ANH DUC TRUONG1 † , NHU THI CHU 1 HOAI NAM VU 1 , HUYEN THI NGUYEN 1 , TINH NGUYEN 2 , FATIMAH SITI 2 , HANS LEE 2 , ALEXANDER DE LEON 2 , ANDREW G, YERSIN 3 , HOANG VU DANG 1*

¹Department of Biochemistry and Immunology, National Institute of Veterinary Research, 86 Truong Chinh, Dong Da, Hanoi 100000, Vietnam

²Kemin Animal Nutrition and Health, Asia Pacific 12 Senoko Drive, 758200 Singapore 3Kemin Industries, Inc. Des Moines, IA 50317, USA

[†]Both authors contributed equally to this work

Parole chiave: Virus della peste suina africana, β-glucano, citochine.

ABSTRACT PREMESSA

La peste suina africana (ASF) è una delle malattie più importanti dei suini a causa dei suoi effetti su tutte le età e le razze. Ad oggi, non esistono vaccini e farmaci commerciali per la prevenzione della PSA e la sopravvivenza del virus della peste suina africana (ASFV) in varie matrici ambientali, aziendali o alimentari ha permesso al virus di rimanere, causando nuovi focolai nella popolazione suina. Oltre alla biosicurezza e alle pratiche di gestione dell'allevamento, il miglioramento delle risposte immunitarie dell'ospite è fondamentale per controllare, gestire e prevenire la PSA.

OBIETTIVO

In questo studio abbiamo analizzato il ruolo protettivo del β -glucano contro l'infezione da ASFV utilizzando un modello di analisi dei macrofagi alveolari suini (PAM).

METODI

Gli effetti del β -glucano sulla proliferazione cellulare sono stati valutati con il saggio del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro. I potenziali effetti del β -glucano contro un ceppo di ASFV isolato in Vietnam sono stati ulteriormente esaminati mediante PCR e saggi di emadsorbimento in tempo reale. La produzione di interferone (IFN)- α e di interleuchina (IL)-6 indotta dal β -glucano è stata determinata con un immunosonda enzimatico immunosorbente (ELISA). Lecitochine sono state ulteriormente analizzate utilizzando il kit ELISA per IFN- α e IL-6 in base alle istruzioni del produttore (Invitrogen, Walthalth).

RISULTATI

I nostri risultati hanno dimostrato che l'additivo β -glucano possiede un fattore di stimolo immunitario contro l'ASFV. In particolare, la protezione delle PAM contro l'infezione da ASFV in vitro è stata osservata a 12 ore (p < 0,05) alle dosi testate (30 e 50 µg/ml) come indotto dall'incubazione con il β -glucano per 2 ore. Questi effetti si sono mantenuti fino a 24 ore dopo la post-infezione. Inoltre, a una dose elevata (50 µg/ml), il pretrattamento con il β -glucano ha aumentato statisticamente i livelli di espressione di IFN α e IL-6 rispetto ai gruppi non trattati o alla sola infezione da ASFV.

CONCLUSIONI

L'insieme di questi risultati indica che il β-glucano può proteggere l'ospite dall'infezione da ASFV attraverso molteplici meccanismi immunitari cellulari.

*Corresponding Author: Hoang Vu Dang. Department of Biochemistry and Immunology, National Institute of Veterinary Research, Hanoi, Vietnam. Email: dangnivr@yahoo.com
Articles published in Open Veterinary Journal are licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2023 VINCITORE

LA DISINFEZIONE COME STRUMENTO DI BIOSICUREZZA NELL'ALLEVAMENTO SUINO: INDAGINE DEI BATTERI PATOGENI AMBIENTALI E DELLA RELATIVA ANTIBIOTICORESISTENZA

DISINFECTION AS A BIOSECURITY TOOL IN PIG FARMS: SURVEY ON ENVIRONMENTAL PATHOGEN BACTERIA AND THEIR ANTIBIOTICALRESISTENCE

PERRUCCI A.

Dipartimento di Scienze Veterinarie Università degli Studi di Torino

Parole chiave: biosicurezza, allevamento suino, LA-MRS

Keywords: biosecurity, pig farms, LA-MRS

RIASSUNTO

Recentemente, l'interesse verso la biosicurezza e la sanificazione degli ambienti nell'allevamento suino è cresciuto a causa di agenti infettivi epidemici. L'obiettivo dello studio era di monitorare l'implementazione della biosicurezza in 20 aziende suinicole tramite programmi su misura della durata di 12 mesi, affiancati dalla formazione del personale sulle procedure di disinfezione degli ambienti. La rilevazione dell'ATP ambientale è stata utilizzata come biomarker. In un sottocampione di 10 aziende, i tamponi sono stati analizzati anche per rilevare batteri sentinella di antibioticoresistenza: Livestock-Associated Stafilococchi Meticillino Resistenti (LA-MRS) ed Extended spectrum β-lactamase producing E. coli (ESBL-E. coli). Un significativo miglioramento dello score medio della biosicurezza (P = 0.047) e del valore di ATP ambientale (P = 0.039) è stato osservato nei 12 mesi. Tra i siti di campionamento, il tubo di alimentazione ed il beverino hanno mostrato i valori più alti di ATP (P = 0,048) residui dopo i lavaggi. Nei tamponi ambientali LA-MRS è stato rilevato in 58/80 siti di campionamento ed ESBL-E. coli in 13/80. Confrontando quanto ritrovato nel pre- e nel post-sanificazione è stata osservato un lieve calo di LA-MRS (2,5%) ed un marcato decremento di ESBL-E. coli (27.5%). I risultati suggeriscono che un piano su misura che includa la formazione del personale sia utile per migliorare biosicurezza e pulizia aziendali. In un'ottica One Health, maggiori sforzi andrebbero indirizzati verso procedure specifiche per LA-MRS, anche per la salute dell'operatore.

ABSTRACT

Recently, interest in biosecurity, especially in ambient sanitization, has enormously increased because of epidemical infective agents and their rapid spread through globalization. The aim of this study was to monitor biosecurity measures implementation in pig farms along with a project of staff training and specific 12 months intervention, including environmental investigation (ATP). Moreover, in a sub-sample of 10 farms, swabs, collected before and after the sanitization procedures, were analyzed to detect antibiotic resistant bacteria: Livestock Associated *Satphylococcus* Methicillin Resistant and ESBL – $E.\ coli.$ A significant improvement of the biosecurity average score was observed during these 12 months (P=0,047) and the average level of ATP in environmental swabs has decreased. A tailor-made biosecurity implementation plan associated with the detection of ATP level and personnel training seems to be useful to

improve the application of biosecurity measures and the farmers' awareness regarding weakness of their own procedures, including hygiene management. The feeding tubes and nipple drinkers were found to be the sample sites with the highest ATP level. In the environmental swabs LA-MRSA was detected in 58/80 sampling sites and ESBL-*E. coli* in 13/80. Comparing the fundings in the pre- and post-sanitizations it was observed a moderate decreased of LA-MRS (2,5%) and a sharp decline of ESBL-*E. coli* (27,5%). These results suggest that sanitization is an important part of biosecurity, and it must be included in farms improvement plans, especially considering the risk for human health and in terms of *One Health* due to the isolation of MRSA and ESBL form environmental swabs in barns.

INTRODUZIONE

La biosicurezza consiste nell'applicazione di misure atte a limitare l'ingresso e la diffusione di un agente infettivo in allevamento e rappresenta la chiave per prevenire e/o limitare il rischio di infezione degli animali, ed è ormai pacifico che un più alto livello di biosicurezza è essenziale per il benessere animale e per migliorare le performance produttive dell'allevamento [1,2,3]. La sanificazione è una misura di biosicurezza, che, se adeguata, impedisce il perpetuarsi dell'infezione negli animali successivamente accasati. In passato l'igiene in allevamento è stata sottostimata, ma negli ultimi tempi è via via riconosciuta come una dei componenti fondamentali di un buon management aziendale: una scarsa condizione igienica in allevamento riduce le performance produttive, e rappresenta un importante fattore di rischio per la salute degli animali [4].

Il personale è un elemento chiave nella gestione aziendale [5]: la scarsa formazione del personale e la mancanza di comunicazione fra il personale sono fattori associati alla non-compliance dell'applicazione della biosicurezza [6,7]. Infatti, l'educazione e l'informazione sono considerate elementi chiave per l'applicazione di una routine di biosicurezza [8,9], che deve essere messa in pratica proprio dal personale. Nonostante ciò, alcuni autori riportano che spesso fra tutte le strategie per la prevenzione delle malattie infettive gli allevatori non scelgono la formazione del personale su questo tema, nonostante sia considerato un intervento a basso costo [10]. Assicurare un migliore stato sanitario degli animali attraverso l'implementazione della biosicurezza e un buon protocollo di sanificazione comporta un minor bisogno di ricorrere ai trattamenti antibiotici [5,7], con risvolti positivi per la lotta contro l'antimicrobicoresistenza [11] ed economici per l'allevatore. Perciò i costi per l'implementazione della biosicurezza non dovrebbero essere percepiti dall'allevatore come un ostacolo [12], quanto piuttosto come un investimento per ottimizzare la produzione ed ottenere un miglioramento dello stato sanitario degli animali [13].

L'obiettivo della tesi è stato quello di approfondire il tema dell'implementazione delle misure di biosicurezza e di valorizzare la sanificazione degli ambienti negli allevamenti suinicoli attraverso parametri input e output in un campione di convenienza di 20 allevamenti suinicoli nell'arco di 12 mesi. Gli input, ovvero la valutazione sistematica della biosicurezza tramite il *Biosecurity Risk Analysis Tool* (BEAT) e l'implementazione della formazione degli addetti alla sanificazione tramite la checklist, sono stati usati per sviluppare un protocollo su misura per ciascun allevamento al fine di implementare il livello di biosicurezza e le procedure di sanificazione. Il protocollo è stato monitorato per i successivi 12 mesi. Il parametro output è stato la misurazione ambientale dell'ATP, potenziale biomarker espressione di detta implementazione. Inoltre, per indagare sulla presenza di batteri sentinella di antibiotico resistenza, all'inizio dello studio sono state eseguite delle indagini batteriologiche in un sotto-campione di 10 aziende per rilevare

Livestock Associated - Stafilococchi Meticillino Resistenti (LA-MRS) e Escherichia coli produttori di ESBL (ESBL-E.coli), attraverso uno studio cross-sectional. Sono stati scelti questi microrganismi in quanto diffusi in molti tipi di produzioni animali e negli uomini che lavorano in stretto contatto con essi [14,15].

MATERIALI E METODI

Questo progetto di tesi rientra nel progetto più ampio *Healthy livestock* di *Horizon* 2020, un programma di ricerca ed innovazione dell'Unione Europea.

Aziende in esame. Nello studio sono state coinvolte 20 aziende, tutte situate nel Nord Italia, attraverso un campionamento di convenienza, selezionate in modo casuale da una lista fornita dal soccidante. Le aziende erano tutte sotto lo stesso contratto di soccida al fine di minimizzare gli effetti dei requisiti contrattuali ed i diversi tipi di accordo relativamente alla biosicurezza tra il soccidante e la soccida [16].

Il questionario BEAT. Prima del reclutamento, ciascun allevamento è stato contattato via telefono ed informato del progetto per ottenere il consenso, dato da tutti gli allevatori contattati. In totale, gli allevamenti sono stati visitati tre volte nell'arco di 12 mesi. Lo stato di biosicurezza delle 20 aziende è stato descritto usando il questionario BEAT. Il questionario ricopre diversi aspetti rilevanti della biosicurezza ed è servito per determinare se una misura preventiva è stata o meno applicata e se una specifica situazione fosse presente o assente. Questo metodo strutturato e completo per valutare la biosicurezza è stato sviluppato sulla base di conoscenze pregresse e sull'esperienza, prendendo in considerazione il modello a 3 zone della FAO [17] e la checklist dell'università di Ghent [3,18], ed è stato precedentemente applicato in ambito suinicolo da Scollo et al. [19]. Il questionario include 5 sezioni principali relative alla biosicurezza esterna e interna: la zona rossa (all'esterno del perimetro aziendale), la zona arancione (area professionale fra i ricoveri zootecnici), la zona verde (la parte interna che comprende i ricoveri per gli animali), e le due interfacce fra le zone esterna/lavorativa (rossa/arancione) e lavorativa/ interna (arancione/verde). Le informazioni sullo stato attuale e passato della biosicurezza sono state raccolte con il BEAT durante una prima visita in ciascuna azienda; dopo l'identificazione dei punti critici relativi alla biosicurezza con il BEAT, è stato elaborato e messo per iscritto un piano di implementazione delle misure di biosicurezza studiato su misura per ciascun allevamento da parte dell'allevatore in collaborazione con il medico veterinario aziendale e con input da parte del personale aziendale [20]. Questo assicurava che il piano potesse effettivamente essere messo in atto da parte del personale. Dopo 6 mesi, è stato eseguito un follow-up in progress per verificare la compliance del piano di biosicurezza. Se necessario, il piano scritto è stato modificato o aggiornato durante la sua applicazione, come suggerito da Donaldson [20]. Dopo 12 mesi dalla prima visita lo stato di biosicurezza è stato analizzato nuovamente attraverso il BEAT. Tutte le aziende sono state visitate dal medesimo veterinario così da minimizzare il più possibile il bias legato all'intervistatore e poter assicurare il confronto della stessa azienda nelle tre visite.

Formazione del personale. All'inizio del progetto, tutti gli allevatori e il personale addetto alle procedure di sanificazione sono stati coinvolti in una formazione su tali procedure, al fine di illustrarne la corretta esecuzione per essere efficaci. Tale formazione è consistita in un incontro frontale di gruppo, al quale hanno partecipato tutti gli addetti aziendali alla sanificazione. Il docente era un esperto di sanificazione degli ambienti suinicoli. Sono stati illustrati tutti i passaggi chiave della sanificazione tramite l'utilizzo

di slides in Power Point e numerosi video e foto esemplificativi, lasciando, alla fine dell'incontro, una mezz'ora dedicata alla discussione delle problematiche riportate dai discenti. Durante i 12 mesi di studio, ciascuna azienda è stata inoltre visitata almeno una volta dall'esperto di sanificazione per l'affiancamento nelle procedure di pulizia dei capannoni.

Campionamento dei biomarker ambientali per l'analisi rapida dell'ATP. La misurazione ambientale (biomarker) della presenza di patogeni tramite il contenuto di ATP è stata effettuata in tutte e 20 le aziende alla prima e alla terza visita. La raccolta dei tamponi è stata eseguita in due momenti diversi: prima delle procedure di sanificazione (capannone sporco) e dopo le procedure di sanificazione, ovvero subito prima dell'accasamento dei nuovi animali, al fine di verificare il livello di igiene come descritto da Heinemann et al. [21]. In ciascun allevamento, sono stati individuati cinque siti di campionamento: il pavimento di fronte alla mangiatoia, il tubo di alimentazione, il beverino, il trogolo e il materiale manipolabile. Tutti i tamponi sono stati subito testati per l'analisi dell'ATP (CleanTrace Surface ATP Test Swab UXL100, 3M, Neuss, Germany), che consente di ottenere una valutazione rapida dell'efficacia delle procedure di sanificazione della struttura attraverso la valutazione della materia organica residua e della contaminazione microbiologica [22,23]. Tramite questa analisi si possono identificare in modo oggettivo i punti critici o difficili da pulire [23].

Indagini batteriologiche. Il campionamento dei tamponi ambientali per la ricerca di LA-MRS ed ESBL-*E. coli* è stato effettuato in un sottocampione di 10 aziende. In ciascun allevamento, sono stati campionati 4 siti: il beverino, il trogolo, il pavimento nell'angolo di defecazione e il materiale manipolabile. Questi sono riportati come i punti di maggior contaminazione da ESBL e LA-MRS da altri autori [21, 24]. Il prelievo è stato eseguito alla prima visita in allevamento prima della sanificazione del box e dopo la sanificazione.

Indagini microbiologiche per la ricerca di LA-MRS. L'isolamento di LA-MRS è stato eseguito come descritto da Bonvegna et al. [25] ma lievemente modificato. All'arrivo il tampone è stato inserito in un terreno liquido selettivo di prearricchimento, il *Triptone Soy Broth – Enr* (TSB – Enr), addizionato di 2,5% di NaCl, cefoxitina (3,5 mg/L) e aztreonam (20 mg/l). La cefoxitina viene aggiunta per selezionare gli stafilococchi meticillino resistenti (MRS) mentre l'aztreonam per inibire la crescita di batteri Gramnegativi. Dopodiché i campioni sono stati messi in incubatore per 18-24 h a 37 ± 1 °C a 240 rpm. Al termine dell'incubazione, ciascun campione è stato seminato su terreno solido MSAm – FOX, costituito da MSA (*Mannitol Salt Agar*) al 6% di NaCl e addizionato di cefoxitina (FOX a 3,5 mg/L). Dopo un'identificazione presuntiva in base al fenotipo fino a 5 colonie di *Staphylococcus* sono state trapiantate sul terreno solido TSA (*Tryptic Soy Agar*) e usate per l'analisi successiva. Per l'analisi di conferma dell'identificazione fenotipica è stato usato il MALDI – TOF MS, utilizzando il software MALDI Biotyper compass 3.1 per l'identificazione del *genus* e/o della specie.

Per l'analisi genotipica di conferma sono state usate le 5 colonie trapiantate su TSA ed incubate per 24 h a 37 ± 1°C. L'estrazione del DNA è stata eseguita con il metodo di lisi alcalina adattato da Tramuta et al. [26]. Ciascuna colonia è stata stemperata in una soluzione acquosa 1:10 di NaOh 5 M e vortexata. Dopo 30 minuti, è stato aggiunto il TRIS con volume pari al volume di soluzione NaOh usato, vortexato e centrifugato; poi l'estratto è stato congelato. Sugli estratti di DNA sono state eseguite 2 PCR, una in grado di identificare il genus *Staphylococcus* (16S rDNA *gene*), l'altra di rilevare la resistenza

genotipica alla meticillina (*mecA gene*). Ad ogni PCR sono stati aggiunti un controllo positivo (un ceppo *S. aureus* ottenuto dalla Collezione di Colture di microrganismi dell'Università di Torino) ed un controllo negativo (DNA *free water*).

Indagini microbiologiche per la ricerca di ESBL-E. coli. Per l'isolamento di ESBL-E. coli è stato seguito, ma lievemente modificato, il protocollo proposto dall'EUCAST [27]. I tamponi hanno subito un primo passaggio di prearricchimento in acqua peptonata e poi sono stati messi in incubatore a 37 ± 1 °C e 240 rpm per 18-24 h. Dopodiché ciascun campione è stato seminato su piastre con terreno solido MacKonckey 3 addizionato di 1 mg/L di cefotaxime, poi messe in incubatore a 37 ± 1 °C per 18-24 ore. Dopo un'identificazione presuntiva in base al fenotipo delle colonie di E. coli, fino a 5 colonie sono state trapiantate su terreno TSA e sottoposte all'analisi di conferma tramite MALDITOF MS. Per la conferma fenotipica è stato usato il combination disc test, con cui si valutano le zone di inibizione di ESBL da parte della cefalosporina da sola e con l'acido clavulanico. L'isolato è definito ESBL quando la differenza fra i due aloni è maggiore e/o uguale a 5 mm.

Analisi statistica

Per il calcolo dello score di biosicurezza è stato adottato il metodo suggerito da Diana et al. [28] ma parzialmente modificato. È stato calcolato un valore di biosicurezza in ciascuna delle cinque zone dell'allevamento sommando lo score dei vari fattori appartenenti a ciascuna zona. Tutti questi valori sono stati poi trasformati in percentuale da zero a 100, dove lo zero indicava uno scarso livello, mentre 100 indicava un buono stato. L'analisi dei dati è stata eseguita con XLSTAT 2022.2.1 (Addinson, USA, 2022). È stata eseguita un'analisi descrittiva con i dati raccolti durante la prima visita. È stato utilizzato il Kendall Tau test per misurare la relazione fra le variabili in entrambe le visite 1 e 3. La significatività statistica è stata fissata ad un volare di probabilità minore di 0,05. I risultati del prima e dopo il piano di intervento sono stati analizzati con il test di Wilcoxon signed-rank per identificare i cambiamenti dei valori della media nel tempo [29]. Per indagare i parametri output del piano di biosicurezza allevamento-specifico durante lo studio, è stata eseguita un'ulteriore analisi descrittiva sulla differenza di ciascuna parametro tra la visita 1 e la visita 3 con il test di Kenadll Tau e con il Principal Component Analysis (PCA) e la Hierarchical Cluster Analysis (HCA). Gli allevamenti con misure di biosicurezza simili sono stati aggregati in cluster con la HCA [16]. I dati derivanti dall'analisi dei tamponi per l'analisi dell'ATP sono stati analizzati con il test di Kruscall-Wallis con confronti multipli usando il metodo di Duns e la correzione di Bonferroni. I dati derivanti dall'indagine microbiologica sono stati valutati con una semplice analisi descrittiva.

RISULTATI

Un'analisi descrittiva degli allevamenti al momento della visita 1 e della visita 3 è riportata nella Tabella 1, mentre un'illustrazione grafica del punteggio della biosicurezza per ogni allevamento alla visita 1 e dopo l'intervento è riportata nella Figura 1. Il miglioramento medio post-intervento è stato di $1.44 \pm 2.05\%$.

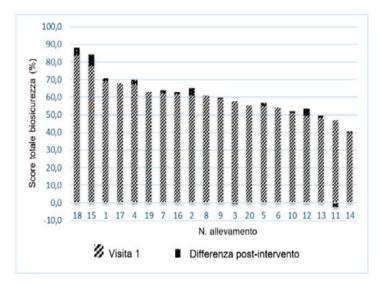
Tabella 1. Analisi descrittiva degli allevamenti (n=20) all'inizio e alla fine dello studio: score di biosicurezza per ciascuna zona e valori di ATP (RLUs).

Table 1. Farms (n=20) descriptive analysis at the beginning and at the end of the study: biosecurity score for each zone and ATP values (RLUs).

	Prima visita Media ± sd (minimo-massimo)	Terza visita Media ± sd (minimo-massimo)	P-value
Punteggi di biosicurezza			
Zona rossa (%)	$61,0 \pm 11,2 (43,7 - 7,5)$	$60,5 \pm 10,2 (47,9 - 87,5)$	ns
Transizione rossa/arancione (%)	$54,2 \pm 16,6 \ (25,0 - 80,2)$	$54.9 \pm 17.7 \ (25.0 - 84.4)$	ns
Zona arancione (%)	$56,2 \pm 13,3 \ (35,0 - 85,0)$	$61,0 \pm 14,8 \ (37,5-92,5)$	0,012
Transizione arancione/verde (%)	$37,6 \pm 7,6 \ (27,6 - 48,7)$	$38,0 \pm 7,7 \ (27,6-48,7)$	ns
Zona verde (%)	$69,6 \pm 7,0 \ (58,3 - 81,5)$	$69,7 \pm 7,5 \ (58,3 - 81,5)$	ns
Score totale biosicurezza (%)	$55,7 \pm 8,7 \ (38,7 - 70,9)$	$56.8 \pm 9.4 (39.5 - 77.5)$	0,047
Tamponi ambientali (RLUs*)	$2240 \pm 1603 \ (179 - 8167)$	$1213 \pm 1205 \ (265 - 3739)$	0,031
*Unità Relative Luce			

Figura 1. Punteggio totale della biosicurezza dei 20 allevamenti coinvolti nello studio e la relativa differenza nel post-intervento.

Figure 1. Total biosecurity score in the 20 farms involved in the study e their post-intervention difference.



I livelli di ATP dei tamponi ambientali nei 5 siti di campionamento (Figura 2) hanno mostrato una differenza statisticamente significativa (P-value 0.048), con i più alti livelli riscontrati nel tubo di alimentazione (3152.3 \pm 2997.2 RLUs).

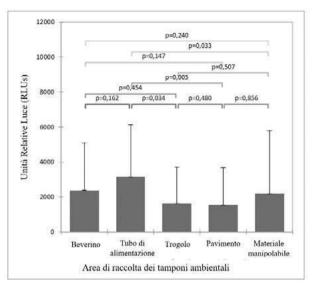


Figure 2. Valori medi del contenuto di ATP dei tamponi ambientali espresso in RLUs per ciascuno dei 5 siti di campionamento.

Figure 2. Average ATP values, in RLUs, of environmental swabs for each of 5 sampling sites.

I risultati della PCA e della HCA hanno portato all'individuazione di due cluster (1; 2) di allevamenti relativi alla relazione tra lo score di biosicurezza e i tamponi ambientali. Le principali caratteristiche che descrivono i 2 cluster sono riportati nella Tabella 2 accompagnata da una descrizione sottostante.

Tabella 2. Score di biosicurezza e dei biomarker nei 2 clusters di aziende identificati con PCA e HCA.

Table 2. Biosecurity score and ATP value in the 2 clusters of farms as identified by PCA e HCA.

Parametro	Cluster 1	Cluster 2
N. allevamenti	8	12
Zona rossa (%)	0 ± 0	-0.2 ± 2.2
Transizione rossa/arancione (%)	$3,6 \pm 0,6$	0.6 ± 1.7
Zona arancione (%)	$11,2 \pm 7,8$	$2,3 \pm 4,0$
Transizione arancione/verde (%)	$5,6 \pm 3,5$	0.4 ± 1.1
Zona verde (%)	$1,6 \pm 1,2$	0,1 ±0,2
Score totale biosicurezza (%)	$4,4 \pm 1,7$	0.6 ± 0.8
Tamponi ambientali (RLUs*)	-2837 ± 1978	-700 ± 1860

Cluster 1: allevamenti che hanno migliorato il loro score della biosicurezza e ridotto il contenuto di ATP dei biomarker. Tutte e 5 le aree hanno contribuito al miglioramento del punteggio totale di biosicurezza.

Cluster 2: allevamenti che hanno scarsamente incrementato il loro punteggio di biosicurezza e hanno mostrato un limitato calo del contenuto di ATP nei biomarker. La maggior parte degli allevamenti (12 su 20) sono rientrati in questo cluster.

I risultati delle indagini batteriologiche sono riassunti nella Tabella 3, dove per ciascun sito di campionamento è indicata la frequenza di rilevamento. Degli 80 campioni prelevati durante la visita 1 per la ricerca di LA-MRS sono risultati positivi il 65%, mentre la positività di *ESBL-E. coli* è del 16,25%. La differenza del livello di contaminazione dal pre- al post-sanificazione è molto marcato per ESBL-*E. coli* (27,5%), mentre è lieve per i LA-MRS (2,5%).

Tabella 3. Frequenza di rilevamento di LA-MRS ed ESBL - *E. coli* per ciascun sito di campionamento e la frequenza totale negli allevamenti (n = 10) coinvolti nello studio di tipo cross-sectional.

Table 3. Detection frequency of LA-MRS and ESBL-E. coli for each sampling site and total detection frequency in all the farms involved in the cross-sectional study (n=10).

		Allevamenti del sotto % positivi (N. I		
LA-MRS	Sito di campionamento	Pre-sanificazione	Post-sanificazione	_
	Beverino	70% (7/10)	60% (6/10)	_
	Trogolo	80% (8/10)	70% (7/10)	
	Pavimento nell'angolo di defecazione	50% (5/10)	60% (6/10)	
	Materiale manipolabile	70% (7/10)	70% (7/10)	
% positività totale		67,5% (27/40)	65% (26/40)	65% (52/80)
ESBL - E. coli				_
	Beverino	10% (1/10)	10% (1/10)	
	Trogolo	30% (3/10)	0% (0/10)	
	Pavimento nell'angolo di defecazione	60% (6/10)	0% (0/10)	
	Materiale manipolabile	20% (2/10)	0% (0/10)	
% positività totale		30% (12/40)	2,5% (1/40)	16,25% (13/80)

La specie di *Staphylococcus* più rilevata è stata *Staphylococcus sciuri* (31%), seguita da *S. aureus* (24%), *S. saprophyticus* (22%) e *S. equorum* (13%).

DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente lavoro era di approfondire le misure di biosicurezza applicate in un campione di convenienza di allevamenti suinicoli, e di valutare il risultato del loro miglioramento un anno dopo, a seguito dell'applicazione di un protocollo su misura studiato in base alle carenze evidenziate dal BEAT. Il BEAT è stato applicato e testato in un campione di 20 allevamenti, fornendo una valutazione del punteggio dell'implementazione iniziale e l'evoluzione nei successivi 12 mesi nelle diverse aree dell'allevamento. In base al miglioramento ottenuto da ciascuna azienda nel corso dei 12 mesi, sono stati definiti 2 profili (*clusters*) di tipologia di allevamento. Per ciascun profilo, una descrizione dell'output sottoforma di biomarker ambientale è stata fornita durante lo studio.

Il miglioramento medio delle misure di biosicurezza durante lo studio è stato statisticamente significativo, nonostante non tutti gli allevamenti avessero implementato nuove misure di insicurezza nel tempo. Il generale miglioramento dello score della biosicurezza può essere legato alla maggiore probabilità che si riesca ad ottenere l'implementazione delle misure dopo l'azione di un piano di biosicurezza elaborato su misura per ciascun allevamento, poiché viene scritto e sviluppato dall'allevatore in collaborazione con il medico veterinario aziendale, e con input forniti dal personale [20]. Questo approccio assicura che il piano di biosicurezza possa realisticamente essere implementato dal personale aziendale, instaurando

una collaborazione per identificare le "migliori pratiche" per il management aziendale che includa le misure di biosicurezza. Il fallimento nell'applicazione delle misure di biosicurezza di alcuni allevamento probabilmente è spiegato dalla scarsa motivazione nell'indagare in nuove strutture e nel cambiare la propria routine quotidiana, come riportato da altri autori [30], spinto dalla scarsa percezione dei benefici per l'allevamento [6,31,32].

Attraverso la rilevazione di materia organica residua al termine della sanificazione tramite l'analisi rapida dell'ATP, è possibile fornire una valutazione oggettiva del successo della pulizia e rendere l'allevatore maggiormente consapevole del proprio lavoro. Questo è in accordo con i cluster identificati dall'analisi statistica, in cui sono stati distinte aziende che hanno incrementato lo score di biosicurezza di pari passo ad un marcato decremento dell'ATP, e aziende che hanno scarsamente incrementato lo score di biosicurezza e registrato solo una discreta riduzione dell'ATP. Dai risultati ottenuti emerge che il tubo di alimentazione e il beverino sono i siti più contaminati e perciò devono essere considerati come i maggiori punti critici di pulizia, come riportato in altri studi [21,23]. Mannion et al. [24] hanno rilevato che dopo la sanificazione mangiatoie e beverine siano più contaminate rispetto ai pavimenti, in accordo con i nostri risultati. In generale, i siti che presentano discontinuità e fessure e che non sono ben visibili, ma richiedono di chinarsi o un'attenta ispezione visiva sembrano essere dimenticati durante la pulizia [21]. Anche il tempo è un fattore chiave per il successo della pulizia: influenza l'accuratezza delle procedure di sanificazione, e questo enfatizza l'importanza di una conoscenza dei punti deboli specifici per ciascun allevamento [34].

Un ulteriore obiettivo della tesi era quello di monitorare la presenza di germi resistenti all'interno dell'allevamento e verificare l'effetto della sanificazione su di essi. Il livello totale di contaminazione da LA-MRS trovato, corrispondente al 65% dei tamponi totali testati, è in linea con altri studi [25]; mentre il livello totale di ESBL –*E. coli* è del 16,25%, alta rispetto ad altri valori riportati in un report EFSA [35]. Fra le specie di LA-MRS, quella più rilevata è stata *S. sciuri* (31%), in accordo con altri studi [25, 36, 37]. Si ipotizza che la predominanza di *S. sciuri* nell'ambiente dell'allevamento sia legata alla colonizzazione del naso degli animali, dovuta alla loro naturale inclinazione a grufolare [25]. Inoltre, la frequenza di rilevamento di *S. aureus* meticillino-resistente è del 24%, valore in linea con altri studi, sebbene con una certa eterogeneità [15, 38, 39].

Fra le specie di LA-MRS, quella più rilevata è stata S. sciuri (31%), in accordo con altri studi (Bonvegna et al., 2021; Schoenfelder et al., 2017b; Sinlapasorn et al., 2015; Zhang et al., 2009). Si ipotizza che la predominanza di S. sciuri nell'ambiente dell'allevamento sia legata alla colonizzazione del naso degli animali, dovuta alla loro naturale inclinazione a grufolare (Bonvegna et al., 2021). Inoltre, la frequenza di rilevamento di S. aureus meticillino-resistente è del 24%, valore in linea con altri studi, sebbene con una certa eterogeneità (Rodríguez-López et al., 2020; Parisi et al., 2019; Pirolo et al., 2019).

Sebbene i risultati ottenuti sul miglioramento dello score di biosicurezza e sulla riduzione dei livelli di ATP ambientali, la riduzione della prevalenza di LA-MRS dal pre- al post-sanificazione è stata quasi impercettibile (-2,5%), a differenza di quanto osservato per ESBL–E. coli (-27,5%). Si può dunque ipotizzare che l'efficacia delle procedure di sanificazione su LA-MRS non vada necessariamente di pari passo il miglioramento delle condizioni di biosicurezza, né con i livelli di ATP ambientale post-sanificazione, bensì richieda delle procedure più specifiche. Si ipotizza inoltre che le procedure di sanificazione standard in allevamento siano più efficaci nei confronti di ESBL-E. coli rispetto ai LA-MRS, ma sono necessari ulteriori studi. Data la presenza di geni resistenti ai disinfettanti in S. aureus

meticillino-resistente originario dei suini [40], occorrono ulteriori indagini per approfondire la possibilità di resistenza ai prodotti utilizzati da parte di tali germi. Un severo protocollo di sanificazione è necessario per migliorare lo stato sanitario in allevamento: in generale, l'igiene stessa è stata proposta come *critical control point* per la valutazione dell'allevamento suinicolo [41]. In questo contesto LA-MRS ed ESBL–*E. coli* potrebbero essere utilizzati come indicatori per la presenza di batteri resistenti nel settore suinicolo [42].

La competenza dell'operatore nell'esecuzione delle procedure di sanificazione è un elemento critico [24]: una sanificazione corretta ed efficace dipende sempre dalla competenza di chi svolge il lavoro [43-45]. La conoscenza è spesso vista come un elemento chiave per cambiare il comportamento; se gli individui non conoscono l'impatto delle proprie azioni, allora non possono aspettarsi di cambiare l'approccio verso una certa sfida [46]. La formazione del personale, fattore che in questo studio ha garantito una riduzione dei livelli di contaminazione da ATP, già descritto da Heinemann et al. [21], ha colmato la mancanza di comunicazione fra operatori e i consulenti di biosicurezza. Gli autori suggeriscono che una possibilità per migliorare il management dell'igiene in allevamento potrebbe essere lo sviluppo di un protocollo di igiene specifico per ciascun allevamento in collaborazione con un medico veterinario come supervisore. Con questo protocollo la verifica delle operazioni dovrebbe essere eseguita tramite l'autocontrollo; questa impostazione è simile a protocolli già esistenti nell'industria alimentare, conosciuti come monitoraggio dell'autocontrollo. Una formazione mirata accompagnata dal monitoraggio dei risultati può aiutare ad aumentare l'efficacia e prevenire la disattenzione dovuta alla routine.

La presenza di stafilococchi meticillino resistenti ed ESBL-*E. coli* negli animali costituisce un pericolo per gli operatori del settore: è già stata documentata la trasmissione di ceppi LA-MRSA ed ESBL-*E. coli* tra uomo e suini [14,47,48]. Questi ceppi possano passare all'uomo attraverso il contatto diretto con animali vivi e l'aria e la polvere contaminate dei capannoni [49,50]. Perciò tutti coloro che si trovano a lavorare in stretto contatto con i suini o semplicemente all'interno dei capannoni sono a rischio di contaminazione [14,15], che però si estende anche a chi ha un regolare contatto con questa classe di lavoratori [51]. Inoltre, l'aria esausta in uscita dai capannoni può essere una fonte di LA-MRSA per gli allevamenti vicini e l'ambiente [52]. Considerando i risultati del presente studio, è evidente come sia importante monitorare in allevamento tali microrganismi resistenti e potenziali zoonosici. La salute pubblica e l'importanza veterinaria di LA-MRSA ed ESBL-*E. coli* sottolinea il bisogno di un intervento effettivo per controllare la diffusione di questi ceppi zoonotici; è auspicabile un intervento che si basi su un approccio di tipo *One Health*.

CONCLUSIONE

I risultati del presente studio supportano l'ipotesi di altri autori riguardo l'efficacia di programmi di intervento su misura per ciascun allevamento, che derivano da una stretta comunicazione fra allevatore e veterinario, in quanto aumenta la disponibilità e la credibilità delle informazioni. Sembra che i piani elaborati su misura migliorino l'applicazione delle misure di biosicurezza e la consapevolezza degli allevatori verso i punti deboli della gestione aziendale, incluse le procedure di pulizia. La formazione del personale si è dimostrata essere fondamentale nella riduzione dei valori espressi dai biomarkers ambientali di pulizia, e la quantificazione dell'ATP sembra essere uno strumento promettente nella valutazione rapida dell'efficacia della sanificazione. Un'efficacie sanificazione è un fattore chiave nel controllo delle malattie infettive con un impatto positivo sulle performance produttive dell'allevamento

e sul benessere animale [40]. Inoltre, la persistenza di LA-MRS dopo la sanificazione rappresenta un problema da affrontare con maggiori sforzi e protocolli specifici, soprattutto considerando che tali germi costituiscono un pericolo non solo per gli operatori del settore, ma per la salute pubblica in generale; è perciò auspicabile un approccio alla biosicurezza di tipo *One Health*.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Gleeson, B. L., & Collins, A. M. (2015) "Under what conditions is it possible to produce pigs without using antimicrobials?" in Animal Production Science (Vol. 55, Issues 11–12, pp. 1424–1431).
- 2. Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D., & Dewulf, J. (2013). "Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds" in Veterinary Journal, 198(2), 508–512.
- 3. Ribbens, S., Dewulf, J., Koenen, F., Mintiens, K., de Sadeleer, L., de Kruif, A., & Maes, D. (2008) "A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds" in Preventive Veterinary Medicine, 83(3–4), 228–241.
- 4. Pastorelli, H., le Floc'h, N., Merlot, E., Meunier-Salaü N, M. C., van Milgen, J., & Montagne, L. (2012) "Sanitary housing conditions modify the performance and behavioural response of weaned pigs to feed- and housing-related stressors" in Animal, 6(11), 1811–1820.
- 5. Davies, R., & Wales, A. (2019) "Antimicrobial Resistance on Farms: A Review Including Biosecurity and the Potential Role of Disinfectants in Resistance Selection" in Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (Vol. 18, Issue 3, pp. 753–774).
- Casal, J.; De Manuel, A.; Mateu, E.; Martín, M. (2007) "Biosecurity measures on swine farms in Spain: perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures" in Prev Vet Med, 82, 138-150.
- 7. Rodrigues Da Costa, M., Gasa, J., Calderón Díaz, J. A., Postma, M., Dewulf, J., McCutcheon, G., & Manzanilla, E. G. (2019) "Using the Biocheck.UGentTM scoring tool in Irish farrow-to-finish pig farms: assessing biosecurity and its relation to productive performance" in Porcine Health Management, 5(1).
- 8. Lewerin, S. S., Österberg, J., Alenius, S., Elvander, M., Fellström, C., Tråvén, M., Wallgren, P., Waller, K. P., & Jacobson, M. (2015) "Risk assessment as a tool for improving external biosecurity at farm level" in BMC Veterinary Research, 11(1).
- 9. Sayers, R. G., Sayers, G. P., Mee, J. F., Good, M., Bermingham, M. L., Grant, J., & Dillon, P. G. (2013) "Implementing biosecurity measures on dairy farms in Ireland" in Veterinary Journal, 197(2), 259–267.
- Can, M. F., Altuğ, N., & Kaygisiz, F. (2020) "Biosecurity levels of livestock enterprises in Turkey and factors affecting these levels" in Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 44, 632–640.
- 11. Comunicazione della Commissione europea al Consiglio e al Parlamento europeo. (2017) "Piano d'azione europeo "One Health" contro la resistenza antimicrobica". Disponibile online: http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf. (consultato il 24 gennaio 2023).
- 12. Raasch, S., Collineau, L., Postma, M., Backhans, A., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Beilage, E. grosse, Stärk, K., & Dewulf, J. (2020) "Effectiveness of alternative measures to reduce antimicrobial usage in pig production in four European countries" in Porcine Health Management, 6(1).
- 13. Collineau, L., Rojo-Gimeno, C., Léger, A., Backhans, A., Loesken, S., Nielsen, E. O.,

- Postma, M., Emanuelson, U., Beilage, E. grosse, Sjölund, M., Wauters, E., Stärk, K. D. C., Dewulf, J., Belloc, C., & Krebs, S. (2017) "Herd-specific interventions to reduce antimicrobial usage in pig production without jeopardising technical and economic performance" in Preventive Veterinary Medicine, 144, 167–178.
- Lewis C., H., Mølbak, K., Reese, C., Aarestrup M., F., Selchau, M., Sørum, M., & Skov L., R. (2009) "Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in Humans, Denmark" in Emerging Infectious Disease, 14(9).
- 15. Pirolo, M., Visaggio, D., Gioffrè, A., Artuso, I., Gherardi, M., Pavia, G., Samele, P., Ciambrone, L., di Natale, R., Spatari, G., Casalinuovo, F., & Visca, P. (2019) "Unidirectional animal-to-human transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pig farming; evidence from a surveillance study in southern Italy" in Antimicrobial Resistance and Infection Control, 8(1).
- 16. De Oliveira Sidinei, M.E.A.; Marcato, S.M.; Perez, H.L.; Bánkuti, F.I. (2021) "Biosecurity, environmental sustainability, and typological characteristics of broiler farms in Paraná State, Brazil" in Prev Vet Med, 194, 105426.
- 17. FAO. Disponibile online: https://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/news 060815b.html (consultato il 23/01/2023).
- 18. BiocheckUGent, 2022 https://biocheckgent.com/fr (consultato il 24/01/2023).
- 19. Scollo, A., Levallois, P., Fourichon, C., Motta, A., Mannelli, A., Lombardo, F., & Ferrari, P. (2022) "Monitoring Means and Results of Biosecurity in Pig Fattening Farms: Systematic Assessment of Measures in Place and Exploration of Biomarkers of Interest" in Animals, 12(19), 2655.
- 20. Donaldson, A. (2008) "Biosecurity after the event: risk politics and animal disease" in Environ Plan A, 40, 1552-1567.
- 21. Heinemann, C.; Meyer, I.; Bögel, F.T.; Schmid, S.M.; Hayer, J.J.; Steinhoff-Wagner, J. (2020) "Individual training for farmers based on results from protein and ATP rapid tests and microbiological conventional cultural methods improves hygiene in pig fattening pens" in J Anim Sci, 98, skz389.
- 22. Green, T. A., Russell, S. M., & Fletcher, D. L. (1999) "Effect of Chemical Cleaning Agents and Commercial Sanitizers on ATP Bioluminescence Measurements" in Journal of Food Protection (Vol. 62, Issue 1).
- 23. Luyckx, K., Dewulf, J., van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J., Vervaet, E., Heyndrickx, M., & de Reu, K. (2014) "Comparison of sampling procedures and microbiological and nonmicrobiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses" in Poultry Science, 94(4), 740–749.
- 24. Mannion, C.; Lynch, P.B.; Egan, J.; Leonard, F.C. (2007) "Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland" in Vet Rec 2007, 61, 371–375
- 25. Bonvegna, M.; Grego, E.; Sona, B.; Stella, M.C.; Nebbia, P.; Mannelli, A.; Tomassone, L. (2021) "Occurrence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRcons) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from pigs and farm environment in northwestern Italy" in Antibiotics, 10, 676.
- 26. Tramuta, C.; Robino, P.; Nucera, D.; Salvarani, S.; Banche, G.; Malabaila, A.; Nebbia, P. (2014) "Molecular characterization and antimicrobial resistance of faecal and urinary Escherichia coli isolated from dogs and humans in Italy" in Vet Ital, 50, 23–30. https://doi.org/10.12834/vetit.1304.09.
- 27. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Disponibile online: http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/EUCAST_detection_resistance_mechanisms_V1.pdf (consultato il 24/01/2023).
- 28. Diana, A.; Lorenzi, V.; Penasa, M.; Magni, E.; Alborali, G.L.; Bertocchi, L.; De Marchi,

- M. (2020) "Effect of welfare standards and biosecurity practices on antimicrobial use in beef cattle" in Sci Rep, 10, 1-13.
- 29. Siengsanan-Lamont, J.; Kamolsiripichaiporn, S.; Ruanchaimun, S.; Patchimasiri, T.; Jongrakwattana, B.; Blacksell, S.D. (2019) "Biosafety and Biosecurity Challenges Facing Veterinary Diagnostic Laboratories in Lower-Middle income Countries in Southeast Asia: a case study of Thailand" in Appl Biosaf, 24, 220-230.
- 30. Maunsell, F., & Donovan, G. A. (2008) "Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements" in Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 24(1), 155–190.
- 31. Laanen, M., Maes, D., Hendriksen, C., Gelaude, P., de Vliegher, S., Rosseel, Y., & Dewulf, J. (2014) "Pig, cattle and poultry farmers with a known interest in research have comparable perspectives on disease prevention and on-farm biosecurity" in Preventive Veterinary Medicine, 115(1–2), 1–9.
- 32. Valeeva, N.I.; van Asseldonk, M.A.; Backus, G.B. (2011) "Perceived risk and strategy efficacy as motivators of risk management strategy adoption to prevent animal diseases in pig farming" in Prev Vet Med, 102, 284-295.
- 33. Luyckx, K., Millet, S., van Weyenberg, S., Herman, L., Heyndrickx, M., Dewulf, J., & de Reu, K. (2016) "A 10-day vacancy period after cleaning and disinfection has no effect on the bacterial load in pig nursery units" in BMC Veterinary Research, 12(1).
- 34. Gosling, R. J., Martelli, F., Wintrip, A., Sayers, A. R., Wheeler, K., & Davies, R. H. (2014 "Assessment of producers' response to *Salmonella* biosecurity issues and uptake of advice on laying hen farms in England and Wales" in British Poultry Science, 55(5), 559–568.
- 35. EFSA (2011) "Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended spectrum β-lactamases and/or AmpC β-lactamases in food and food-producing animals" in EFSA Journal, 9(8).
- 36. Schoenfelder, S. M. K., Dong, Y., Feßler, A. T., Schwarz, S., Schoen, C., Köck, R., & Ziebuhr, W. (2017) "Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments" in Veterinary Microbiology, 200, 79–87.
- 37. Sinlapasorn, S., Lulitanond, A., Angkititrakul, S., Chanawong, A., Wilailuckana, C., Tavichakorntrakoo, R., Chindawong, K., Seelaget, C., Krasaesom, M., Chartchai, S., Wonglakorn, L., & Sribenjalux, P. (2015) "SCCmec IX in meticillin-resistant Staphylococcus aureus and meticillin-resistant coagulase-negative staphylococci from pigs and workers at pig farms in Khon Kaen, Thailand" in Journal of Medical Microbiology, 64(9), 1087–1093. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000119
- 38. Rodríguez-López, P., Filipello, V., di Ciccio, P. A., Pitozzi, A., Ghidini, S., Scali, F., Ianieri, A., Zanardi, E., Losio, M. N., Simon, A. C., & Alborali, G. L. (2020) "Assessment of the antibiotic resistance profile, genetic heterogeneity and biofilm production of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from the Italian swine production chain" in Foods, 9(9)
- 39. 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" in Food Microbiology, 82, 287–293
- 40. Wong, T. Z., Zhang, M., O'Donoghue, M., & Boost, M. (2013) "Presence of antiseptic resistance genes in porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*" in Veterinary Microbiology, 162(2–4), 977–979.
- 41. Von-Borell, E., Bockisch, F.-J., Buscher, W., Hoy, S., Krieter, J., Muller, C., Parvizi, N., Richter, T., Rudovsky, A., Sundrum, A., & van den Weghe, H. (2001) "Critical control

- points for on farm assessment of pig housing" in Livestock Production Science (Vol. 72).
- 42. Schmithausen, R. M., Schulze-Geisthoevel, S. V., Heinemann, C., Bierbaum, G., Exner, M., Petersen, B., & Steinhoff-Wagner, J. (2018) "Reservoirs and transmission pathways of resistant indicator bacteria in the Biotope pig stable and along the food chain: a review from a One Health perspective" in Sustainability (Switzerland) (Vol. 10, Issue 11). MDPI.
- 43. Carrique-Mas, J. J., Marín, C., Breslin, M., McLaren, I., & Davies, R. (2009) "A comparison of the efficacy of cleaning and disinfection methods in eliminating *Salmonella spp*. from commercial egg laying houses" in Avian Pathology, 38(5), 419–424.
- 44. Gosling, R. (2018) "A review of cleaning and disinfection studies in farming environments" in Livestock, 23(5), 232–237.
- 45. 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" in PLoS ONE, 12(6).
- 46. Shannon, C.; Stebbing, P. D.; Dunn, A.M.; Quinn, C.H. (2020) "Getting on board with biosecurity: evaluating the effectiveness of marine invasive alien species biosecurity policy for England and Wales" in Marine Policy, 122, 104275.
- 47. Cuny, C., Wieler, L. H., & Witte, W. (2015) "Livestock-Associated MRSA: the impact on humans" in Antibiotics (Vol. 4, Issue 4, pp. 521–543). MDPI AG.
- 48. Carattoli, A. (2008) "Animal reservoirs for extended spectrum β-lactamase producers" in Clinical Microbiology and Infection (Vol. 14, Issue SUPPL. 1, pp. 117–123). Blackwell Publishing Ltd.
- 49. Friese, A., Schulz, J., Hoehle, L., Fetsch, A., Tenhagen, B. A., Hartung, J., & Roesler, U. (2012) "Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns" in Veterinary Microbiology, 158(1–2), 129–135.
- 50. Schmithausen, R. M., Kellner, S. R., Schulze-Geisthoevel, S. V., Hack, S., Engelhart, S., Bodenstein, I., Al-Sabti, N., Reif, M., Fimmers, R., Körber-Irrgang, B., Harlizius, J., Hoerauf, A., Exner, M., Bierbaum, G., Petersen, B., & Bekeredjian-Ding, I. (2015) "Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and of *Enterobacteriaceae* expressing extended spectrum beta-lactamases on a model pig farm" in Applied and Environmental Microbiology, 81(21), 7633–7643.
- 51. Graveland, H., Wagenaar, J. A., Bergs, K., Heesterbeek, H., & Heederik, D. (2011) "Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact" PLoS ONE, 6(2).
- 52. Friese, A., Schulz, J., Zimmermann, K., Tenhagen, B. A., Fetsch, A., Hartung, J., & Rösler, U. (2013) "Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity" in Applied and Environmental Microbiology, 79(8), 2759–2766.

PREMIO CASIMIRO TAROCCO 2023 VINCITORE

"END THE CAGE AGE": È POSSIBILE RIDURRE IL TEMPO TRASCORSO DALLE SCROFE IN RECINTO INDIVIDUALE NELLA PRIMA FASE DI GESTAZIONE?

"END THE CAGE AGE": IS IT POSSIBLE TO REDUCE THE TIME SOWS SPEND IN INDIVIDUAL STALLS IN THE FIRST STAGE OF GESTATION?

BORDIGNON E., GALLI M.C., CONTIERO B., GOTTARDO F.

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova

Parole Chiave: Scrofe, Gestazione, Benessere animale

Keywords: Sows, Gestation, Animal Welfare

RIASSUNTO

In base alla legislazione vigente, le scrofe possono essere allevate in recinti individuali per quattro settimane dopo la fecondazione. L'iniziativa "End the Cage Age", tuttavia, chiede la fine dell'utilizzo di ogni tipo di gabbia. Le lotte gerarchiche, frequenti quando si forma un nuovo gruppo, destano però preoccupazioni: si teme che il passaggio al box di gruppo, nelle prime fasi della gestazione, possa avere un effetto negativo su benessere e performance riproduttive. L'obiettivo dello studio è quello di valutare l'effetto dell'imbrancamento su benessere (lesioni, concentrazioni del cortisolo), condizione corporea (spessore del lardo dorsale), performance riproduttive (fertilità ecografica, portata al parto) e dimensioni della nidiata, in base al giorno in cui esso viene realizzato. Le scrofe sono state assegnate a uno dei seguenti trattamenti sperimentali: BOX4G (creazione del gruppo 4 giorni post fecondazione) e BOX28G (creazione del gruppo 28 giorni post fecondazione). Non c'è stato un impatto significativo del trattamento (BOX4G vs BOX28G) su concentrazioni di cortisolo salivare e numero di lesioni dovute a scontri recenti. Non si sono osservate differenze su spessore del lardo dorsale, fertilità ecografica, portata al parto e dimensione della nidiata. Questo studio ha dimostrato quindi che riunire le scrofe in gruppo subito dopo l'inseminazione anziché 28 giorni dopo non ha l'impatto temuto su performance riproduttive e parametri di benessere.

ABSTRACT

Under current EU legislation, sows can be kept in gestation stalls for 28 days post-service. However, the success of the European Initiative "End the Cage Age" clearly demands a total ban on the use of cages Furthermore, pregnant sows fight to establish a hierarchy at mixing. This poses welfare and productivity concerns, particularly if sows are mixed in early pregnancy. The study aimed to compare the effects of the day of mixing (PEN4D:4 days or PEN28D:28 days post-insemination) on measures of animal welfare (skin lesion and cortisol concentrations), on body condition (backfat thickness), reproductive performance (pregnancy and farrowing rate) and litter size. All sows were assigned to one of the two following experimental treatments: PEN4D (4 days post-insemination) and PEN28D (28 days post-insemination). There was no significant impact of treatment on salivary cortisol concentrations and on the number of fresh injuries. No differences were observed for sow's backfat thickness, pregnancy rate, farrowing rate and litter size. This experiment demonstrated that mixing sows into groups early after insemination rather than 28 d after doesn't affect both reproductive performance and measures of sow welfare.

INTRODUZIONE

Il sistema allevatoriale odierno, fondato sulla direttiva 2008/120/CE, prevede che le scrofe possano essere mantenute in gabbia singola fino a quattro settimane dopo l'inseminazione. Tra le motivazioni che hanno condotto alla definizione di questo limite temporale, la più importante è il controllo dello stress sociale, che potrebbe alterare gli equilibri di una fase particolarmente delicata della gravidanza: l'impianto del prodotto del concepimento. La formazione del gruppo, infatti, innesca un comportamento aggressivo tra i vari componenti, che potrebbe indurre uno stress tale da ridurre le performance riproduttive. Allo stesso modo però, il confinamento in gabbia rappresenta un vincolo per l'espressione del comportamento etologico tipico di specie, con effetti deleteri sul benessere. L'iniziativa "End the Cage Age", nata dalle pressioni dei consumatori, ha messo in luce la necessità di ampliare la normativa odierna per eliminare totalmente l'utilizzo delle gabbie anche per le scrofe gestanti. Ciò comporterebbe l'imbrancamento delle scrofe subito dopo lo svezzamento, ma gli studi sulla stabulazione in gruppo in questa fase sono conflittuali. L'allontanamento graduale ma progressivo dalla stabulazione in gabbia singola ha fatto emergere la necessità di implementare la conoscenza riguardo alla stabulazione in gruppo, con il focus su quale sia il momento migliore per imbrancare le scrofe. Le conoscenze sugli effetti del momento di formazione del gruppo dopo l'inseminazione sono limitate: diventa quindi necessario valutarne l'impatto sia nel breve (segni di aggressività, variazioni delle concentrazioni di cortisolo) che nel lungo periodo (condizione corporea, parametri riproduttivi, performance della nidiata). Lo scopo di questo studio è colmare alcune delle lacune sottolineate in precedenza e offrire una base di conoscenze scientifiche utili per formulare una nuova proposta legislativa in risposta alla petizione "End the Cage Age".

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in provincia di Brescia, presso un allevamento commerciale a ciclo chiuso di circa 600 scrofe organizzato in banda trisettimanale. Una volta inseminate, tutte le scrofe della banda sono state assegnate ad uno dei seguenti trattamenti sperimentali:

- BOX4G (n=84): le scrofe sono state trasferite in gruppi statici entro i primi 4 giorni dall'inseminazione.
- BOX28G (n=62): le scrofe sono state stabulate in gabbie singole fino a 28 giorni post inseminazione per poi essere trasferite in gruppi statici.

In entrambi i trattamenti, sono stati utilizzati 4 box contenenti 21 scrofe ciascuno. Lo studio ha coinvolto 4 bande di scrofe svezzate da Marzo a Maggio 2021. Tutte le scrofe sono rimaste nel loro gruppo trattamento approssimativamente fino al giorno 110 di gestazione per poi essere spostate nelle gabbie parto. Tutte le scrofe incluse nello studio erano pluripare e l'ordine di parto variava da 2 a 7.

Ciascun box alloggiava 21 soggetti ed aveva pavimentazione piena. Una catena e un tronchetto legato ad essa sono stati forniti come arricchimenti ambientali. L'alimento è stato somministrato manualmente, tramite spargimento sul pavimento.

Lo spessore del lardo dorsale (BFT= backfat thickness) è stato misurato a livello dell'ultima costa, a 6-7 cm dalla linea mediana (posizione P2) utilizzando un misuratore a ultrasuoni. Il BFT è stato rilevato allo svezzamento e alla fine della gestazione, prima che le scrofe entrassero nelle gabbie parto. La variazione dello spessore durante la gravidanza è stata calcolata come la differenza tra queste due misurazioni.



Figura 1: rilevazione BFT / Figure 1: BFT detection

Inoltre, si sono valutate fertilità ecografica (percentuale di scrofe inseminate che sono risultate gravide alla valutazione ecografica eseguita a 30 giorni di gravidanza), portata al parto (percentuale di scrofe inseminate che hanno partorito) e dimensione della nidiata (nati totali, nati vivi, nati morti e suinetti mummificati): tali parametri sono stati registrati come indicatori dell'efficienza riproduttiva.

Per la rilevazione delle lesioni, il corpo delle scrofe è stato suddiviso in 3 regioni: anteriore, mediana, posteriore. Ad ogni area è attribuito un punteggio secondo una classificazione introdotta da Strawford *et al.* (2008) che prevede quattro punteggi: 0 = assenza di graffi; 1 = 1-3 graffi; 2 = 4-6 graffi; $3 = \ge 7$ graffi. La scala è stata utilizzata sia per la valutazione delle lesioni fresche (sangue visibile) che delle lesioni vecchie (presenza di crosta) e, di conseguenza, ad ogni regione corporea sono stati attribuiti due punteggi: uno relativo alle lesioni fresche e l'altro alle lesioni vecchie. La rilevazione delle lesioni è avvenuta nel giorno 0 (T0), 3 e 7 dall'imbrancamento (T3 e T7).





Figura 2 e 3: esempi di lesioni cutanee / Figure 2 and 3: examples of skin lesions

I campioni di saliva sono stati raccolti per la misurazione della concentrazione di cortisolo nel giorno dell'imbrancamento (T0) e 3 giorni dopo la formazione del gruppo (T3). La saliva è stata raccolta permettendo alle scrofe di masticare tamponi di cotone.



Figura 4: Prelievo salivare / Figure 4: Saliva sampling

I dati continui con distribuzione normale sono stati analizzati mediante Analisi della Varianza, modello che ha considerato l'effetto della banda, del trattamento e l'effetto del tempo nel caso di misure ripetute. I dati non parametrici sono stati elaborati usando il test di MannWitney

RISULTATI

Al momento dello svezzamento, non si sono riscontrate differenze tra i trattamenti nello spessore del lardo dorsale (BFT) (BOX4G = 15.1 mm vs BOX28G = 16.4 mm; P=0.11). Come riportato in Tabella 1, le due tempistiche per la formazione dei gruppi non hanno avuto effetti sulle variazioni del BFT durante la gravidanza (P=0.42). Non si sono evidenziati effetti sugli indicatori di efficienza riproduttiva: fertilità ecografica e portata al parto. Inoltre, non è stato riscontrato un effetto del trattamento sul numero totale dei suinetti nati, numero di nati vivi, nati morti o suinetti mummificati.

Tabella 1. Effetto della fase gestazionale al momento dell'imbrancamento (BOX4G e BOX28G) sui valori di BFT e sulle performance riproduttive.

Table 1. Effect of stage of gestation at mixing (PEN4D and PEN28D) on measurements of backfat and reproductive performance.

		BOX4G	BOX28G	P Value
Parametri valutati:				
Variazione del BFT 1	mm	4.7 ± 0.49	4.1 ± 0.59	0.42
Fertilità ecografica 2	%	87 (73/84)	90 (56/62)	0.71
Portata al parto 2	%	85 (71/84)	90 (56/62)	0.44
Numero totale di suinetti nati 1	n.	15.1 ± 0.45	15.3 ± 0.51	0.75
Suinetti nati vivi 1	n.	13.3 ± 0.41	13.7 ± 0.47	0.55
Nati morti 3	%	6 (0-13)	2 (0-10)	0.31
Mummificati 3	%	0 (0-0)	0 (0-4)	0.18

- 1. I dati distribuiti normalmente sono stati riportati come media quadratica minima \pm errore standard
- 2. I dati rilevati sono stati analizzati utilizzando il test Z per il confronto di due proporzioni
- 3. I dati che non sono distribuiti normalmente sono stati riportati come mediane (scarto interquartile)
- 1. data normally distributed were reported as ls-means \pm standard error
- 2. count data were analysed using two proportions z-test
- 3. data not normally distributed were reported as median (interquartile range)

Non si è rilevato un effetto significativo del trattamento sul numero di lesioni fresche nelle diverse regioni, sebbene ci fosse la tendenza nelle scrofe del BOX28G ad avere dei punteggi maggiori nella regione anteriore al T0 e T7 rispetto alle scrofe del BOX4G (P= 0.05; Tabella 2). Per quando riguarda i graffi vecchi, un effetto significativo del trattamento è stato osservato solo a 3 giorni dall'imbrancamento. Infatti, è stato attribuito un punteggio maggiore a carico della regione anteriore nelle scrofe appartenenti al trattamento BOX28G rispetto alle scrofe del BOX4G (P=0.005; Tabella 2). A prescindere dal trattamento sperimentale, si è riscontrato un effetto significativo del tempo (P<0.0001) sulle lesioni fresche e vecchie in tutte le regioni corporee (Tabella 2). Relativamente alle lesioni fresche, esse risultano sempre maggiori nel giorno della formazione del gruppo (T0) rispetto a T3 e T7 (P<0.0001). I punteggi delle lesioni fresche sono diminuiti tra il giorno T3 e T7 ma non erano statisticamente differenti, tranne per il BOX4G a carico della regione anteriore (T3=0.6 vs T7=0.1; P=0.010) e per il BOX28G nella regione mediana (T3=0.3 vs T7=0.0; P=0.011), in cui la riduzione era statisticamente significativa. Per quanto concerne le lesioni vecchie, al T3 e T7 queste sono risultate sempre maggiori rispetto al T0 (P<0.0001). I punteggi delle lesioni vecchie si sono ridotti tra il T3 e il T7, ma questi non erano statisticamente differenti, ad eccezione della regione anteriore del BOX28G (T3=7.2 vs T7=4.3, P<0.0001), in cui la riduzione era statisticamente significativa. Tabella 2. Effetto della fase gestazionale al momento dell'imbrancamento (BOX4G e BOX28G) e del tempo (giorni dall'imbrancamento) sulle lesioni corporee. I valori sono presentati come mediane (minimo - massimo)

Table 2. Effect of stage of gestation at mixing (PEN4D and PEN28D) and of time (days after mixing) on skin injuries. Values presented as median (minimum-maximum). Le diverse lettere indicano valori significativamente differenti lungo le colonne. Different letters mean significant different values along columns

			Trattamenti		
Regione		Tempo (giorni	BOX4G	BOX28G	P Value
corporea		dall'imbrancamento)			
Anteriore	Fresche	T0	5.1 <i>a</i> (0-17)	5.9A (0-15)	0.05
		T3	0.6b (0-5)	0.3 <i>B</i> (0-4)	0.19
		T7	0.1 <i>c</i> (0-3)	0.3B (0-3)	0.05
		P Value	< 0.0001	< 0.0001	
	171		0.0 <i>b</i> (0-1)	0.0 <i>C</i> (0-0)	0.12
	Vecchie	T3	5.6a (0-14)	7.2 <i>A</i> (2-15)	0.005
		T7	5.2a (0-14)	4.3 <i>B</i> (0-12)	0.13
		P Value	< 0.0001	< 0.0001	
Mediana	Fresche	T0	2.2a (0-6)	1.7A (0-6)	0.10
		T3	0.2b (0-2)	0.3B (0-3)	0.15
		T7	0.1 <i>b</i> (0-1)	0.0 <i>C</i> (0-1)	0.47
		P Value	< 0.0001	< 0.0001	
	Vecchie	T0	0.0 <i>b</i> (0-1)	0.0B (0-0)	0.37
		T3	2.4a (0-7)	2.3A (0-6)	0.75
		T7	2.4a (0-7) 2.2a (0-6)	1.8A (0-5)	0.73
					0.17
		P Value	< 0.0001	< 0.0001	
Posteriore	Fresche	T0	1.8a (0-6)	1.4 <i>A</i> (0-5)	0.44
			0.1 <i>b</i> (0-2)	0.3B (0-5)	0.30
		T7	0.0b (0-2)	0.1 <i>B</i> (0-2)	0.81
		P Value	< 0.0001	< 0.0001	
	Vecchie	T0	0.0b (0-0)	0.1B (0-2)	0.05
		T3	1.9a (0-6)	1.8A (0-5)	0.81
		T7	1.6a (0-7)	1.5A (0-4)	0.72
		P Value	< 0.0001	< 0.0001	

Non si è evidenziato un effetto significativo del trattamento sulle concentrazioni del cortisolo salivare, nonostante si sia riscontrato un effetto significativo del tempo (P<0.001). Le concentrazioni di cortisolo si sono ridotte tra il T0 e il T3 sia per il BOX4G (T0=9.8 nmol/l vs T3=5.4 nmol/l, P<0.001) che per il BOX28G (T0=7.8 nmol/l vs T3=4.0 nmol/l, P<0.001). Tabella 3. Effetto della fase gestazionale al momento dell'imbrancamento (BOX4G e BOX28G) e del tempo (giorni dall'imbrancamento) sulle concentrazioni di cortisolo salivare (nmol/l).

Table 3. Effect of stage of gestation at mixing (PEN4D and PEN28D) and of time (days after mixing) on salivary cortisol concentrations (nmol/l).

	Tratt		
Tempo	BOX4G	BOX28G	P Value
ТО	9.8	7.8	0.82
Т3	5.4	4.0	0.31
P Value	< 0.001	< 0.001	

DISCUSSIONE

Dai risultati di questo studio si evince che imbrancare le scrofe immediatamente dopo l'inseminazione (entro 4 giorni dall'AI) anziché 28 giorni dopo non determina un impatto negativo sulle performance riproduttive né sui parametri di valutazione del benessere delle scrofe, anche in un allevamento intensivo commerciale.

Lo spessore del lardo dorsale permette di valutare lo stato delle riserve corporee e dipende sia dalla quantità di alimento somministrata, che dalla capacità delle scrofe di accedervi. Durante la gravidanza, le scrofe necessitano di quantità adeguate di nutrienti per supportare la crescita fetale. Inoltre, hanno bisogno di ristabilire il ridotto bilancio energetico risultante dalla lattazione precedente(Spoolder *et al.*, 2009)irrespective of husbandry system. The reason for these differences between farms is not known, but of great importance to the pig industry which is moving worldwide from individual to group housing systems, mainly for animal welfare reasons. Therefore, the aim of this review is to list the most likely success and risk factors for group housing of sows in early pregnancy, in relation to reproduction (such as pregnancy rate. Di conseguenza, un ridotto guadagno di lardo dorsale, specialmente nelle prime tre settimane di gestazione, può avere conseguenze negative sulle performance riproduttive.

La variazione similare nello spessore del lardo dorsale registrata durante la gravidanza tra i due trattamenti dimostra come sia possibile imbrancare le scrofe nelle prime fasi gestazionali senza effetti avversi sulla condizione corporea. Ciò è particolarmente importante considerando che le scrofe erano state alimentate tramite distribuzione sul pavimento, un sistema di somministrazione della razione particolarmente competitivo (Edwards, 1992), che spesso determina una variazione considerevole di BFT tra le scrofe. Nel presente studio si è constatato che imbrancare le scrofe subito dopo l'inseminazione o più tardivamente non ha determinato alcun effetto su performance riproduttive (fertilità ecografica e portata al parto) o su dimensioni della nidiata. La letteratura si dimostra piuttosto divergente in merito: il nostro studio, coerentemente con le ricerche di Cunha *et al.* (2018), Stevens *et al.* (2015)and there is a worldwide move to house gestating sows in groups. We examined the effects of day of mixing following insemination on aggression, injuries and stress in sows. A total of 800 sows were used in this experiment and we examined the effects of mixing sows in groups within 1 to 7 days post-insemination (Group0 e Kirkwood e Zanella (2005), ha riscontrato performance riproduttive paragonabili tra

le scrofe imbrancate a 28 giorni post inseminazione rispetto a quelle messe in gruppo subito dopo. Al contrario, altri studi hanno evidenziato una minor portata al parto nelle scrofe imbrancate precocemente rispetto a quelle stabulate in gruppo tardivamente (Li and Gonyou, 2013; Knox et al., 2014). La discrepanza nei risultati è influenzata da diverse variabili, tra cui: diverso management dei gruppi, dimensione del gruppo, pavimentazione, spazio e design del box (Spoolder et al., 2009). L'assenza di un effetto sulle dimensioni della nidiata è supportato da altri studi (Kirkwood and Zanella, 2005; Li and Gonyou, 2013; Knox et al., 2014; Stevens et al., 2015; Cunha et al., 2018) e ciò conferma che lo stress associato all'imbrancamento non è così severo da influire sulla sopravvivenza embrionale. Secondo Turner et al. (2002), solo gli eventi stressanti che portano a un aumento prolungato del cortisolo influiscono sulla sopravvivenza embrionale. I risultati ottenuti dall'analisi delle concentrazioni del cortisolo salivare e delle lesioni cutanee confermano la natura acuta dello stress relativo all'imbrancamento degli animali, dal momento che entrambi gli aspetti analizzati hanno subito un decremento significativo 3 giorni dopo la formazione del gruppo, in ambo i trattamenti. Sebbene lesioni, aggressioni e stress conseguenti alla formazione della gerarchia sociale siano pronunciati soprattutto nelle prime 24-48 ore dalla formazione del gruppo (Dolf, 1986), solo pochi studi hanno esaminato gli effetti a breve termine dell'imbrancamento in relazione alla fase gestazionale in cui è stato formato il gruppo, mostrando oltretutto risultati contraddittori. Nel nostro studio, le tempistiche di formazione del gruppo non hanno influito significativamente nel breve periodo sulle lesioni cutanee e sul cortisolo salivare. In accordo con Strawford et al. (2008), il punteggio delle lesioni cutanee è simile tra le scrofe appartenenti ai due trattamenti. Gli studi di Li e Gonyou (2013) and Cunha et al. (2018) hanno riscontrato che le scrofe imbrancate nelle prime fasi della gravidanza presentavano meno lesioni cutanee rispetto a quelle imbrancate nel periodo post impianto, ma le rilevazioni sono state effettuate alla fine della gestazione, e pertanto riguardano l'effetto nel lungo periodo. In contrasto con quanto detto, altri studi (Knox et al., 2014; Stevens et al., 2015) hanno riportato che le scrofe imbrancate nelle fasi precoci della gestazione avevano più lesioni cutanee rispetto a quelle imbrancante successivamente, ma solo nel breve periodo. In contrasto con i risultati ottenuti dal nostro studio, Stevens et al. (2015) hanno riscontrato che le scrofe messe in gruppo subito dopo l'inseminazione avevano concentrazioni di cortisolo maggiori all'imbrancamento rispetto alle scrofe imbrancante a 35 giorni di gestazione. Tale differenza non è stata evidenziata a 7 e 91 giorni dall'imbrancamento. Sebbene nello studio di Stevens et al. (2015) l'effetto del tempo sulla concentrazione non sia stato analizzato, i dati presentati nell'articolo dimostrano che le concentrazioni di cortisolo salivare 7 giorni dopo la formazione del gruppo erano inferiori rispetto al giorno dell'imbrancamento. Questi valori sono in accordo con i nostri risultati, in cui le concentrazioni di cortisolo si sono ridotte tra il T0 e il T3 sia per il BOX4G che per il BOX28G. Due studi (Strawford, 2008; Knox et al., 2014) hanno rilevato concentrazioni di cortisolo maggiori nelle scrofe imbrancate tardivamente rispetto a quelle imbrancate immediatamente dopo l'inseminazione. Entrambi gli articoli, tuttavia, non hanno valutato separatamente i dati raccolti nei diversi giorni e, inoltre, non hanno rilevato le concentrazioni di cortisolo nel giorno stesso dell'imbrancamento. Lo studio di Strawford et al. (2008) ha riscontrato che i livelli di cortisolo salivare sono aumentati nel corso della gestazione. Di conseguenza, i livelli elevati di cortisolo salivare nelle scrofe imbrancate tardivamente potrebbero rappresentare la conseguenza del loro stato fisiologico e non avere un legame con lo stress. In ogni caso, in contrasto con il nostro studio e con i risultati di Stevens et al. (2015) un aumento progressivo delle concentrazioni di cortisolo è stato ritrovato anche nel breve periodo (tra 1 e 3 giorni dalla formazione del gruppo).

CONCLUSIONI

I risultati della ricerca supportano la riduzione significativa del periodo di utilizzo dei recinti individuali, poichè la formazione precoce dei gruppi di scrofe fecondate non determina effetti negativi su efficienza riproduttiva dell'allevamento e su benessere animale. È probabile che i risultati della ricerca siano influenzati positivamente da vari fattori; tra questi, ad esempio, la distribuzione dell'alimento sul pavimento ha permesso alle scrofe di esprimere comportamenti di esplorazione e grufolamento, manifestando il pattern comportamentale tipico della specie. La presenza di pavimentazione completamente piena e non scivolosa, inoltre, ha giocato un ruolo importante nel raggiungere condizioni di stabulazione adeguate. Ulteriori studi sono necessari per confermare tali risultati anche in altri tipi di sistemi di stabulazione di gruppo (con altre tecniche di somministrazione della razione o che impiegano gruppi dinamici) così da individuare il metodo di allevamento più idoneo a gestire in gruppo le scrofe fecondate e potenzialmente gravide.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia integrale nel file completo.

- 1. Cunha, E. C. P. *et al.* (2018) 'Reproductive performance, offspring characteristics, and injury scores according to the housing system of gestating gilts', *Livestock Science*, 210, pp. 59–67. doi: 10.1016/J.LIVSCI.2018.02.008.
- 2. Dolf, C. (1986) 'Agonistic behaviour of dry sows in single stalls and group housing with special reference to the risk of resulting lesions', *Applied Animal Behaviour Science*, 15(2), pp. 193–194. 10.1016/0168-1591(86)90084-5.
- 3. Edwards, S. A. (1992) 'Scientific perspectives on loose housing systems for dry sows.', *Pig Vet. J.*, 28, pp. 40–51.
- 4. Kirkwood, R. and Zanella, A. (2005) 'Influence of Gestation Housing on Sow Welfare and Productivity', *National Pork Board Final Report*.
- 5. Knox, R. *et al.* (2014) 'Effect of day of mixing gestating sows on measures of reproductive performance and animal welfare', *Journal of Animal Science*, 92(4), pp. 1698–1707.
- 6. Li, Y. Z. and Gonyou, H. W. (2013) 'Comparison of management options for sows kept in pens with electronic feeding stations', *Canadian Journal of Animal Science*, 93(4), pp. 445–452.
- 7. Spoolder, H. A. M. *et al.* (2009) 'Group housing of sows in early pregnancy: A review of success and risk factors', *Livestock Science*, 125(1), pp. 1–14.
- 8. Stevens, B. *et al.* (2015) 'Effects of stage of gestation at mixing on aggression, injuries and stress in sows', *Applied Animal Behaviour Science*, 165, pp. 40–46.
- 9. Strawford, M. L., Li, Y. Z. and Gonyou, H. W. (2008) 'The effect of management strategies and parity on the behaviour and physiology of gestating sows housed in an electronic sow feeding system', *Canadian Journal of Animal Science*, 88(4), pp. 559–567. doi: 10.4141/CJAS07114.
- Turner, A. I., Hemsworth, P. H. and Tilbrook, A. J. (2002) 'Susceptibility of reproduction in female pigs to impairment by stress and the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis', *Reproduction, Fertility and Development*, 14(5–6), pp. 377–391. doi: 10.1071/ rd02012.

PREMIO FORMAZIONE PROFESSIONALE ITALIA 2022

DESCRIZIONE DI UN CASO DI ECHINOCOCCOSI SU SCROFE MACELLATE

GAFFURI M., SALVINI F.

INTRODUZIONE

L'echinococcosi nel suino è un'infestazione causata dalla forma larvare dell'*Echinococcus granulosus* (echinococcosi cistica o malattia idatidea) o, più raramente, dall'*Echinococcus multilocularis* (malattia alveolare). (Woolsey & Miller, 2021)

L'echinococco è un endoparassita il cui ciclo biologico necessita di 2 ospiti per il suo completamento: un ospite definitivo (carnivori) e un ospite intermedio (ovini, caprini, bovini e suini).

La forma adulta del parassita vive nell'intestino del carnivoro, che non manifesta alcun segno di malattia, ed elimina le uova attraverso le feci. Le uova diffuse nell'ambiente sono altamente resistenti e possono rimanere infestanti per diversi mesi, fino ad 1 anno (range temperatura +4°C a +15°C). (P. & P.M., 2008)

Gli ospiti intermedi si possono infestare ingerendo le uova presenti nell'ambiente, le quali raggiungono lo stomaco e successivamente il piccolo intestino, dove liberano l'oncosfera (1° forma larvale, larva esacanta) che penetra la parete intestinale e attraverso il circolo ematico o linfatico raggiunge il fegato. Altre oncosfere possono diffondere anche a livello polmonare, renale, splenico, muscolare e cerebrale.

Negli organi si sviluppa il metacestode (2° forma larvale) che forma la cisti idatidea: struttura cistica a contenuto liquido che può essere uniloculare (*Echinococcus granulosus*) con una cuticola fibrosa esterna e una membrana germinale interna, o multiloculare (*Echinococcus multilocularis*) con uno strato germinale sia sulla superficie interna che su quella esterna; quest'ultima è in grado di produrre una lesione più invasiva simile a quella di una neoplasia. (Zimmerman et al., 2019)

Ogni cisti idatidea contiene liquido cistico e protoscolici, spesso indicati come "sabbia idatidea".

Il ciclo si completa nel momento in cui l'ospite definitivo si ciba di organi infestati da cisti con protoscolici vitali, dai quali, in circa 4-6 settimane, si sviluppano le forme adulte del parassita. (Thompson, 2017)

L'echinococcosi cistica è una zoonosi, nella quale l'uomo è considerato un ospite intermedio accidentale o "a fondo cieco", ciò vuol dire che l'uomo non è in grado di trasmettere la malattia ed al suo interno il parassita non può completare il suo ciclo biologico. L'uomo contrae la malattia per ingestione accidentale di uova presenti, ad esempio, in verdure crude mal lavate, portandosi le mani sporche alla bocca o per contatto stretto con cani eliminatori di uova. La sintomatologia varia a seconda degli organi colpiti, può portare a ittero con forte dolore addominale nel caso di cisti epatiche, tosse, dispnea e dolore toracico se il coinvolgimento è polmonare, fino a una grave reazione allergica potenzialmente letale.

Epidemiologia

In Italia il quadro epidemiologico dell'echinococcosi cistica risulta incompleto. I dati relativi alla diffusione della parassitosi non sono aggiornati e spesso riguardano solo gli ospiti intermedi.

Ad oggi non ci sono dati certi sulla prevalenza della malattia sul territorio nazionale e gli studi sull'argomento sono pochi e nella maggior parte dei casi limitati a singole regioni o territori.

Un dato che però sembra emergere è rappresentato dal fatto che l'echinococcosi cistica ha una maggior prevalenza nelle Isole e nel Centro-Sud Italia; ciò può essere attribuito a ragioni socio-economiche, in quanto in queste aree si ha una maggior concentrazione di allevamenti allo stato brado e semibrado, con un elevato numero di cani da pastore. (Garippa et al., 2004)contradictory, and almost exclusively limited to the intermediate hosts. The disease is found most frequently in particular social and economic conditions: widespread use of extensive or semi-extensive sheep farming, illegal slaughtering, and high numbers of sheepdogs and other types of dogs. The highest incidence in sheep is found in Sardinia (70.6-92.8%

L'ospite intermedio più colpito è rappresentato dagli ovini, nel quale, secondo i dati ufficiali EFSA-ECDC del 2009, sulla prevalenza dell'echinococcosi cistica in Italia, è stata riscontrata una positività complessiva dell'11,3% (Nord Italia: 0,1- 0,5%, Centro Italia: 20-80 %, Sud Italia: 4-36%, Sicilia: 58 %, Sardegna: 75%). Il secondo erbivoro più colpito è rappresentato dai caprini (2,5%), seguito dai bovini (0,2%) e dai suini (<0,1%). Uno studio condotto in Italia tra il 1972 e il 1977 ha riportato un'incidenza dell'echinococcosi cistica nel suino del 1,11% (Garippa et al., 2004) contradictory, and almost exclusively limited to the intermediate hosts. The disease is found most frequently in particular social and economic conditions: widespread use of extensive or semi-extensive sheep farming, illegal slaughtering, and high numbers of sheepdogs and other types of dogs. The highest incidence in sheep is found in Sardinia (70.6-92.8%; ciò mette in evidenza che nel passato la presenza della parassitosi era più marcata rispetto ai valori riportati nel 2009. Tale dato può essere spiegato dall'evoluzione che l'allevamento suino ha avuto negli anni, aumentando sempre di più il numero di allevamenti intensivi a discapito di quelli estensivi, luoghi nei quali i suini possono entrare più facilmente a contatto con carnivori escretori.

Echinococcosi nel suino

Il suino, essendo un ospite intermedio, si infetta ingerendo le uova presenti nell'ambiente. (Zimmerman et al., 2019) Tale ingestione è però rara in un allevamento intensivo, in quanto richiede il contatto con feci di carnivori infetti.

Il suino affetto da echinococcosi non manifesta sintomi, quindi la diagnosi viene effettuata post-mortem, attraverso esame necroscopico, esame parassitologico ed esame istologico. Nel suino non è possibile effettuare, come nei carnivori, né l'esame coprologico, né l'esame sierologico, in quanto nel maiale non si sviluppa la forma adulta del parassita e di conseguenza non rappresenta un ospite escretore.

All'esame necroscopico si rilevano le cisti idatidee a livello principalmente del fegato, ma anche nei polmoni, reni, milza, cuore, muscoli e raramente nei testicoli.

Negli organi interessati si osservano cisti di dimensione variabile, contenenti liquido incolore con, talvolta, presenza di sabbia idatidea e cisti figlie. Il reperto più frequente è quello di cisti sterili o cisti calcificate.

Nel suino non esiste una terapia efficace, poiché, come già riportato, non sviluppa la forma adulta del parassita, la quale rappresenta l'unico stadio del ciclo biologico dello stesso in cui si può intervenire tramite trattamenti antiparassitari.

Disposizioni normative:

- L'echinococcosi rientra nelle epizoozie da sottoporre a sorveglianza, art.5 e art 291 dell'Ordinanza sulle epizoozie (OFE) del 27 giugno 1995 (Stato 15 maggio 2001).
- Gli organi presentanti alterazioni dovute alla malattia non sono idonei al consumo (OIgM, Allegato 7, cifra 1.2.6 a).

DESCRIZIONE DEL CASO

Presso un macello del nord Italia, specializzato nella macellazione di scrofe e scarti, è stata individuata la presenza di lesioni epatiche riferibili a Echinococcosi cistica in 3 distinti carichi di scrofe provenienti da 2 aziende dello stesso proprietario (identificate come Allevamento 1 e Allevamento 2).

I 3 arrivi presso il macello risalgono alle seguenti date:

- 13/09/2021
- 21/09/2021
- 19/11/2021

Il primo carico era composto da 29 scrofe, delle quali solo 1 presentava lesioni epatiche riferibili ad echinococcosi cistica, il secondo da 31 scrofe con 3 esemplari sospetti positivi e il terzo da 25 scrofe, delle quali 2 riportavano lesioni da echinococco.

Il 1° e il 3° carico provenivano dall'allevamento 2, per un totale di 3 scrofe sospette positive su 54 (5,5%), mentre il 2° riguardava l'allevamento 1, con 3 esemplari su 31 riportanti lesioni (9,7%).



Figura 1. Fegato di scrofa parassitato da Echinococcus granulosus

Tale sospetto è stato poi confermato da analisi di laboratorio effettuate presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie tramite l'esame parassitologico e l'esame istologico, i quali hanno identificato la presenza di *Echinococcus granulosus*.

Tutte le carcasse risultate positive sono state distrutte.

MATERIALE: FEGATO (SUINO) CONTROLLO UFF.LE / CAMPIONE UFFICIALE			
ANALISI (Metodo)	Campione	Risultato	
ESAME ISPETTIVO (ESAME ISPETTIVO)	1	EFETTUATO Conferito fegato di scrofa. Si osservano a sode espatica, ad estensione multifocale, 11 voluminose prominenze di color bianco porcellana traslucido, tutte di circa 4 cm di diametro, di cui 8 integre, riferbila i actsi diatidee. Al taglio si osserva liquido trasparente con corpuscoli bianchi in sospensione, friferbili a sabbii datidea. Si rinviene inottre calcolo biliare a riempimento del lume della cistifellea, di 8 cm di lunghezza e 4 cm di spessore. Non si osservano ulteriori alterazioni macroscopiche.	
ESAME PARASSITOLOGICO QUALITATIVO (ESAME AL MICROSCOPIO OTTICO) Eseguito da Lab. Parassitologia (LEGNARO) - 21PAR/4740	1	POSITIVO ECHINOCOCCUS GRANULOSUS	
ESAME ISTOLOGICO (E-E / PDP IST 007 2021 Rev. 4) Eseguito da Diagnostica Specialistica (LEGNARO) - 21IST-PD/5628	1	DESCRIZIONE ISTOLOGICA: si osserva una lesione cistica che coinvolge il parenchime epidico costitulo da una spessa membrana laminare con numerose concrezioni calcaree mineralizzate e contenente numerosi protoscolici parassitant. La lesione appare circoscritta da una reazione granulomatosa da corpo estraneo. Il reperto è riconducibile a cisti idatidea.	

Figura 2. Esito di laboratorio positivo ad Echinococcus granulosus

I 2 allevamenti sono scrofaie a ciclo aperto (siti 1), entrambi di circa 650 scrofe e gestiti in bande trisettimanali. Sono situati in pianura padana, entrambi in provincia di Brescia e godono di una posizione privilegiata in quanto non sono vicini ad altri allevamenti. Entrambe le scrofaie (Allevamento 1 e 2) sono gestite con attenzione e professionalità dal personale aziendale e seguono standard di biosicurezza molto elevati. Inoltre, presentano recinzione completa dell'allevamento.

In entrambe le aziende la genetica è di origine danese e la rimonta viene fatta acquistando F1 direttamente dalla Danimarca.

Le scrofette vengono acquistate dalla Danimarca al peso di 40 kg e portate in un terzo allevamento adibito a quarantena fino al raggiungimento di 120 kg. Nel periodo oggetto dello studio, la consegna delle scrofette avveniva ogni 4 mesi e, una volta raggiunto il peso desiderato, venivano smistate nelle due aziende sito 1.

Nell'allevamento quarantena è anche presente uno svezzamento nel quale vengono portati solo i suinetti dell'allevamento 2, i quali, partendo da circa 7-8 kg di peso raggiungono i 30 kg per poi essere venduti.

Le scrofette e gli svezzati, sebbene siano nella stessa azienda, non hanno la possibilità di entrare in contatto, in quanto sono posti in capannoni differenti e nel capannone delle scrofette è presente una barriera sanitaria.

Durante la fase di quarantena le scrofette seguono un programma vaccinale completo e prima dello spostamento nelle 2 scrofaie vengono testate, per PRRS e PCV2, in PCR e Sierologia. In tutti e 3 gli allevamenti i riproduttori sono sottoposti a trattamenti antiparassitari con ivermectina; le scrofette, qualche giorno prima dello spostamento nei siti 1 e le scrofe, 2 volte all'anno.

Le scrofe risultate positive al macello non presentavano sintomi e sono state macellate per cause non correlate all'Echinococcosi cistica; infatti, erano tutte scrofe a fine carriera. Inoltre, in entrambe le scrofaie, non è stata registrata nessuna riduzione delle performance riproduttive, né un aumento della mortalità, sia in gestazione che in sala parto. Il numero dei nati è rimasto costante, come anche l'accrescimento dei suinetti e il loro stato sanitario. L'assunzione di alimento e di acqua, nelle scrofe, sono rimasti invariati e gli esemplari non manifestavano nessun comportamento anomalo, come stress o aggressività.

Nell'allevamento 1 era presente un cane da guardia, il quale però era posto all'interno di un recinto e non aveva la possibilità di entrare in contatto con le scrofe. Nonostante ciò, per escluderlo dalle possibili cause di trasmissione della parassitosi è stato sottoposto ad esame coprologico con esito negativo, presso Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna.

Anche nell'allevamento quarantena era presente un cane, anch'esso isolato da un recinto e senza possibilità di entrare in contatto con i suini; purtroppo non è stato possibile effettuare test diagnostici su di lui, in quanto, alla macellazione delle scrofe positive, il cane non era più in vita.

L'allevamento 2, nel 2022, è stato svuotato completamente per essere venduto; tutti i suinetti sono stati spostati e i riproduttori macellati. Ciò ci ha permesso di proseguire la nostra indagine, consentendoci l'ispezione al macello di tutte le scrofe dell'allevamento, nelle quali però non è più stata rilevata alcuna lesione ascrivibile all' *Echinococcus granulosus*.

L'allevamento 1 è ad oggi ancora in produzione e nei successivi carichi di scrofe a fine carriera non è più stata rilevata la presenza del parassita.

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Questa esperienza ha confermato che nei suini l'echinococcosi cistica è asintomatica e sebbene le lesioni a carico degli organi colpiti siano molto estese ed importanti, l'animale infestato non mostra alcun segno di sofferenza o malessere.

Come già riportato, questa parassitosi negli allevamenti intensivi suini è molto rara, ma rappresenta una condizione da non sottovalutare, in quanto le carcasse positive sono state distrutte, con danno economico per l'allevatore; inoltre fa parte delle zoonosi parassitare, con esito letale nei casi più gravi.

I soggetti più a rischio sono tutti gli operatori che lavorano a stretto contatto con le carcasse suine, come i veterinari o gli operai dei macelli.

Lo scopo della nostra indagine era quello di individuare le cause dell'infestazione delle scrofe positive e siamo riusciti a restringere il campo a due possibili luoghi di trasmissione della parassitosi. Innanzitutto, possiamo escludere le 2 scrofaie, poiché nell'allevamento 1 il cane è risultato negativo all'*Echinococcus granulosus* e nell'allevamento 2 non è mai stato presente. Inoltre, se uno dei due allevamenti fosse stato la causa dell'infestazione, non si spiega come mai anche le scrofe dell'altro allevamento siano risultate positive, in quanto tra le due scrofaie non vi è alcuno trasferimento di animali.

Di conseguenza le cause sono da ricercare a monte, cioè nell'allevamento quarantena o in un gruppo di scrofette arrivate positive. Il primo non si può escludere in quanto il cane è morto prima di poter essere testato e il secondo non ci ha fornito dati storici di positività all'echinococco.

Ciò che però risulta con chiarezza è che l'echinococcosi cistica ha riguardato un gruppo limitato di animali, poiché oltre ai 3 carichi di scrofe macellate non è più stata rinvenuta nessuna lesione riferibile a *Echinococcus granulosus*.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Garippa, G., Varcasia, A., & Scala, A. (2004). Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. *Parassitologia*.
- 2. P., M., & P.M., S. (2008). Echinococcosis: A brief review. In *Journal of Pediatric Infectious Diseases*.
- 3. Thompson, R. C. A. (2017). Biology and Systematics of Echinococcus. *Advances in Parasitology*, https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001
- 4. Woolsey, I. D., & Miller, A. L. (2021). Echinococcus granulosus sensu lato and Echinococcus multilocularis: A review. In *Research in Veterinary Science*. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.11.010
- Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W., & Zhang, J. (2019). Diseases of swine. In *Diseases of Swine*. https://doi.org/10.1002/9781119350927

PREMIO FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2022

APPLICAZIONE DI IR BIOTYPER CON SPETTROSCOPIA A INFRAROSSI A TRASFORMATA DI FOURIER (FTIR) PER LA TIPIZZAZIONE DI ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

APPLICATION OF FOURIER-TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY-BASED IR BIOTYPER SYSTEM FOR TYPING ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUOMONIAE

MORONI B.¹, MUSOLINO N.¹, CORDOVANA M.², MAUDER N.², MARRA C.¹, ALBORALI G.L.³, PITTI M.¹, DECASTELLI L.¹, DONDO A.¹, ZOPPI S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta. Via Bologna 148, Turin. Italy:

> ²Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, 28359 Bremen, Germany; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia-Romagna.

Parole chiave: actinobacillosi; machine learning; pleuropolmonite suina *Keywords*: IR Biotyper; machine learning; porcine pleuropneumonia

RIASSUNTO

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) è l'agente eziologico della pleuropolmonite suina. Ad oggi sono stati descritti almeno 19 sierotipi che possono essere distinti tramite tecniche biomolecolari con costi relativamente elevati. La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIRS) è stata recentemente utilizzata per identificare batteri a livello di specie e sierogruppo/sierotipo, dimostrandosi uno strumento diagnostico pratico, e garantendo risultati rapidi con dei costi contenuti. L'obiettivo principale di questo studio è quello di valutare l'efficacia dell'IR Biotyper (IRBT, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) nella tipizzazione dei diversi sierotipi di APP, utilizzando un panel di 90 isolati batterici raccolti da suini di allevamenti piemontesi.

Il campionamento è avvenuto presso IZSPLV attraverso coltura batterica in agar sangue da polmoni con lesioni compatibili con pleuropolmonite suina. Le colonie sono state identificate con spettrometria di massa MALDI-TOF, e poi analizzate con IR Biotyper. Sono state effettuate analisi delle componenti principali (PCA) e discriminanti lineari (LDA) utilizzando tutto il dataset di isolati batterici. All'analisi multivariata, PCA e LDA hanno mostrato un buon livello di clusterizzazione con chiara distinzione di 7 sierotipi di APP (2,5,6,7,12,13,14). Inoltre, è risultato chiara anche la distinzione tra APP e non-APP (*A. suis, A. lignieresii, A. rossii*). I risultati presentati in questo studio rappresentano un'ottima base di partenza per sviluppare un classificatore si sierotipi di APP.

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) is the causative agent of porcine pleuropneumonia (PP). Currently, 19 APP serotypes have been described, usually determined by molecular analysis, with relatively high costs. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIRS) has been recently proved to be a useful, rapid and cost-effective tool to discriminate bacteria at different taxonomic levels, based on the analysis of the phenotypic microbial cells. The aim of this study was to apply IR Biotyper® system (IRBT, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) to evaluate APP typing at the species and serotype level, in a panel of 90 in field-isolates. All the bacterial collection has been obtained from pig lungs sent to IZPLV for determination of the cause of death. Isolates from lungs were identified by MALDI-TOF MS,

then analyzed with IR Biotyper. Principal components analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) were applied to the whole dataset of isolates. At the multivariate analysis, PCA and LDA showed good clustering with a clear differentiation of seven APP serotypes (2,5,6,7,12,13,14). Moreover, a clear clustering of APP and non-APP (*A. suis, A. lignieresii, A. rossii*) was highlighted. The results presented in this study may be developed in the future by development of a new classifier for APP serotypes. The use of IRBT as a novel artificial intelligence software was proved successful for the implementation of a new diagnostic tool in differentiating APP serotypes in the laboratory's veterinary diagnostic routine.

INTRODUZIONE

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) è stato identificato come agente eziologico della pleuropolmonite contagiosa nel suino dal 1964¹. Inizialmente denominato *Haemophilus pleuropneumoniae*, è stato successivamente riclassificato nel genere *Actinobacillus* sia su base fenotipica che .. È un batterio Gram-negativo, immobile, anaerobio facoltativo con forma coccobacillare³. Se ne distinguono due biovarianti in base alla necessità di Nicotinamide-Adenina-Dinucleotide (NAD) per la crescita: la biovariante 1 è NAD-dipendente, la biovariante 2 è NAD-indipendente poiché in grado di sintetizzarlo autonomamente. Ogni biovariante include differenti sierotipi che si distinguono grazie agli antigeni polisaccaridici⁴, e ad oggi sono almeno 19 i sierotipi conosciuti⁵.

La pleuropolmonite contagiosa del suino presenta una diffusione su scala mondiale, con una distribuzione geografica che varia a seconda delle sierovarianti: le sierovarianti 2 e 9 risultano maggiormente diffuse in Asia ed Europa, le sierovarianti 5 e 7 in Nord America e la 15 in Australia³.

E' una patologia endemica negli allevamenti con frequenti introduzioni di suini dall'esterno, tutti i gruppi risultano suscettibili e il livello di morbilità e mortalità è direttamente proporzionale alle condizioni ambientali, allo stress e alle patologie concomitanti⁶.

L'ospite naturale dell'APP è il suino, ma anche i suidi selvatici risultano suscettibili^{3,7}. Il tempo di incubazione è variabile ma può durare anche solo 12 ore⁷.

La trasmissione di questa patologia avviene principalmente per contatto diretto tra animali, oppure tramite l'inalazione di aerosol nell'aria favorito dall'elevata densità di capi e dalla sintomatologia respiratoria con tosse e starnuti.

I soggetti con forme croniche o subcliniche possono fungere da reservoir mantenendo il batterio nelle vie respiratorie senza sintomi, e favorendo quindi la sua diffusione nell'allevamento.

Le forme cliniche variano da iperacute a croniche. La forma iperacuta ha un decorso rapido di circa 6 ore, e si manifesta con sintomatologia fulminante, tra cui: ipertermia (fino a 41°C), anoressia, depressione, dispnea, tachicardia ed estremità cianotiche.

Spesso si riscontra morte improvvisa senza segni premonitori ma con una caratteristica perdita di sangue e schiuma dal naso.

La forma acuta, seppur manifestando sintomi analoghi alla forma iperacuta, può avere un decorso di 36 ore^{3,4,6}. Queste due forme si riflettono, a livello necroscopico, con il riscontro di lesioni polmonari e pleuriche di tipo fibrino-necrotico-emorragiche^{4,6}. I polmoni solitamente presentano lesioni bilaterali maggiormente distribuite sulla faccia dorsale dei lobi caudali⁶.

La forma cronica può essere invece asintomatica, ma è solitamente caratterizzata da tosse associata ad un mancato accrescimento, oltre ad una generalizzata riduzione delle difese immunitarie con maggiore suscettibilità ad altre patologie virali o batteriche^{3,6}.

Il decorso della malattia dipende in gran parte dalla virulenza del sierotipo coinvolto, oltre alle condizioni predisponenti dell'animale.

In generale, *Actinobacillus pleuropneumoniae* è dotato di fattori di virulenza che agiscono in diverse fasi della patologia e favoriscono la sopravvivenza dell'agente eziologico.

Il batterio, in seguito al suo ingresso nell'apparato respiratorio profondo, colonizza il tessuto polmonare attraverso l'interazione con proteine, muco e cellule ciliate⁹. I fattori di virulenza coinvolti nella fase di adesione sono molteplici: è stato dimostrato un coinvolgimento delle fimbrie¹⁰, ma anche un ruolo dei lipopolisaccaridi all'adesione a livello tracheale¹¹.

A questi fattori di virulenza si accompagnano anche quelli necessari al batterio per acquisire nutrienti: il ferro viene ottenuto grazie alla presenza di transferrine¹⁴, lipopolisaccaridi e proteine leganti l'emoglobina¹⁵; mentre il meccanismo di assorbimento di nickel e cobalto è ad oggi ancora sconosciuto⁹.

I fattori di virulenza maggiormente coinvolti, però, nell'evoluzione della forma clinica e, perciò, quelli di maggiore interesse epidemiologico, si identificano nella categoria delle esotossine (Apx).

Le Apx si distinguono in base al grado di citotossicità, capacità emolitica e presenza/assenza tra i sierotipi^{7.}

La virulenza dei ceppi di APP dipende in prima linea dal sierotipo coinvolto, ma questo a sua volta manifesta una determinata virulenza a seconda delle Apx prodotte. È possibile, infatti, all'interno dello stesso sierotipo, osservare una differente virulenza in seguito a mutazioni che modificano la capacità di produzione delle tossine⁷.

Il sierotipo 2 risulta essere predominante in Europa con forme cliniche molto virulente¹⁷, e diffusa anche in Nord America ma con varianti quasi non virulente¹⁸. In Nord America è possibile riscontrare con maggiore frequenza i sierotipi 5, 7 e 8^{18–20}.

In Europa è presente anche il sierotipo 8, con elevata prevalenza in Inghilterra²¹, e i sierotipi 9, 11, 12, 13 e 16^{17,22}.

L'elevata mortalità e le spese mediche veterinarie associate alla gestione della patologia in allevamento rappresentano importanti fattori nella decision-making dell'industria suinicola^{7,23}. Molti studi hanno dimostrato come la presenza del germe APP possa portare ad una perdita anche in termini di conversione alimentare e scarso accrescimento ponderale dei capi affetti da lesioni croniche polmonari^{24,25}.

Se si considera solo il continente americano, l'impatto economico dell'*Actinobacillus* pleuropneumoniae ha raggiunto una perdita di circa 30 milioni di dollari all'economia statunitense già a partire dal 1995²³.

In considerazione di ciò, risulta essenziale differenziare precocemente i sierotipi circolanti in una determinata area geografica non solo per applicare nei corretti tempi le misure di controllo più efficaci, ma anche per lo sviluppo di vaccini più efficaci nei confronti del sierotipo circolante²⁶.

Ad oggi, le tecniche diagnostiche utilizzate per la sierotipizzazione sono di tipo molecolare o sierologico.

La sierotipizzazione sierologica è possibile tramite agglutinazione, emoagglutinazione indiretta o immunodiffusione, ed era di largo utilizzo fino a pochi anni fa, ma la necessità di un titolo anticorpale elevato, laboratori specializzati e il frequente riscontro di cross-reattività tra sierotipi hanno reso indispensabile l'adozione di tecniche diagnostiche più facilmente accessibili ed affidabili^{19,27}.

È stata inizialmente descritta una PCR con primer arbitrari (AP-PCR)²⁸, successivamente sono state messe a punto PCR con primer sempre più specifici in grado di identificare tutti i sierotipi ad oggi conosciuti²⁹. La sierotipizzazione molecolare si può basare, infatti, sulla ricerca di geni dei polisaccaridi capsulari³⁰⁻³², oppure dei geni delle tossine apx^{33,34}, o ancora della lipoproteina della membrana esterna³⁵, ma anche sulla ricerca di più di queste componenti in associazione^{31,34,36}.

La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIRS) è una tecnica diagnostica storicamente utilizzata in ambito chimico, e solo recentemente applicata in campo microbiologico per la caratterizzazione dei ceppi batterici in base alle differenze fenotipiche. La FTIRS è stata recentemente applicata per discriminare batteri e lieviti a livello di specie, sierogruppo/sierotipo e anche per analisi di outbreaks, dimostrandosi uno strumento diagnostico pratico, e garantendo risultati rapidi con dei costi contenuti.

Infatti, questa metodologia è risultata essere in grado di discriminare le cellule microbiche in relazione alla specifica composizione nelle loro componenti lipidiche, proteiche e polisaccaridiche, in base alla capacità di assorbanza delle molecole stesse³⁷. Per ogni ceppo batterico è possibile ottenere uno spettro di assorbimento unico che rappresenta l'impronta digitale ottenuta sulla base delle componenti della membrana cellulare esterna^{38,39}. Pertanto, la spettroscopia IR permette di classificare i microorganismi a diversi livelli tassonomici, dal genere al sierotipo, fino anche a distinguere i singoli ceppi⁴⁰.

In Italia non sono disponibili informazioni aggiornate sui ceppi APP più diffusi sul territorio. Considerando la variabilità clinica della patologia e le perdite economiche che ne conseguono, risulta essenziale avere un quadro epidemiologico territoriale ben chiaro per poter adottare le migliori misure di prevenzione e controllo.

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare i sierotipi maggiormente circolanti nel territorio piemontese attraverso metodiche accreditate, e validare il sistema IR Biotyper (IRBT – Bruker Daltonics GmbH & Co. KG), un metodo analitico di nuova generazione basato sulla tecnologia di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR), al fine di ottenere un quadro epidemiologico chiaro e offrire un'alternativa diagnostica più rapida e intuitiva.

MATERIALI E METODI

Gli isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* analizzati sono stati ottenuti a partire da campioni di polmoni di suini sottoposti a necroscopia presso la S.S. Patologia Animale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta con sede a Torino.

I polmoni caratterizzati da lesioni tipiche di pleuropolmonite contagiosa, sono stati sottoposti ad esame batteriologico: è stato effettuato un prelievo tramite tampone all'interno della lesione sospetta, previa sterilizzazione/cauterizzazione della superficie esterna e taglio profondo nello spessore della lesione, o tramite semina diretta di un'aliquota di polmone su terreno di crescita Agar sangue di montone defibrinato 5% (Columbia Agar).

Per permettere una crescita ottimale di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, il ceppo è stato seminato su terreno agar sangue di montone defibrinato 5%, e successivamente una lo *Staphylococcus aureus* è stato seminato linearmente per sfruttare il principio dalla crescita satellite (Figura 1): questa tecnica facilita la crescita di APP lungo la linea di *S. aureus* che, producendo un'emolisi completa del terreno, libera fattori nutrienti come NAD. Le piastre seminate sono state poi incubate a 37°C in condizioni di microaerofilia per 24 ore.

Successivamente, le colonie sospette sono state sottoposte ad identificazione MALDI-TOF secondo le istruzioni dell'azienda produttrice (Bruker Daltonics, Bremen, Germania).

I ceppi identificati come *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Actinobacillus* spp. sono stati trapiantati su terreno agar cioccolato e incubati a 37°C in condizioni di microaerofilia per 24 ore.

Tutti i ceppi provenivano da allevamenti suini piemontesi.

I campioni analizzati e utilizzati per il seguente studio sono stati collezionati a partire dal 2019 fino al 2022.

Tutti i ceppi batterici sono stati poi sierotipizzati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna attraverso multiplex PCR.



Figura 1. Ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* seminati su agar sangue con la crescita satellite. In prossimità della semina di *Staphylococcus aureus* (crescita batterica lineare di colore bianco), sulla linea di emolisi, è possibile osservare la crescita di colonie di piccole dimensioni del ceppo APP.

Figure 1. Actinobacillus pleuropneumoniae culture in blood agar with Staphylococcus aureus (white line in the centre) and beta haemolysis surrounding it.

I ceppi di APP del presente studio sono stati analizzati con il sistema IR Biotyper® (IRBT, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG). La preparazione dei campioni è stata eseguita secondo le indicazioni del produttore 41 : 50 μ L di etanolo al 70% vengono aggiunti alla provetta di sospensione contenente cilindri metallici inerti (Bruker IR Biotyper Kit). Uutilizzando un'ansa da 1μ L si preleva del materiale batterico dalla piastra e si stempera nella provettadi sospensione fino ad ottenere una sospensione di colore lattiginoso opaco, si vortexa e si aggiungono 50 μ L di acqua deionizzata. Successivamente, 15 μ L della sospensione vengono deposti su un totale di cinque pozzetti sulla piastra specifica in silicio (Figura 5). Insieme ai campioni, sulla piastra vengono deposti, su due pozzetti ciascuno, due Bruker Infrared Test Standards (IRTS 1, IRTS 2) come controllo di qualità.

La piastra viene messa ad essiccare a 37 °C per circa 10-30 minuti, fino al completo asciugamento dei pozzetti seminati.

L'acquisizione degli spettri è stata effettuata tramite l'utilizzo dello spettrometro IRBT e il software OPUS (Bruker Optics GmbH & Co. KG). Il software IR Biotyper Client (Bruker Daltonics) (V3.1) è stato utilizzato per processare e analizzaregli spettri acquisiti. Per le analisi di similarità sono state applicate a tutti gli isolati le tecniche PCA (principal components analysis) e LDA (linear discriminant analysis).

RISULTATI

Sono stati ottenuti in totale 90 ceppi confermati di *Actinobacillus* spp., di cui 1 *A. lignieresii*, 3 *A. rossii*, 8 *A. suis*, 1 *Actinobacillus* spp. (Tabella 1).

Bacterial species	APP Serotype	N (field strain)
A. pleuropneumoniae	2	17
A. pleuropneumoniae	5	6
A. pleuropneumoniae	6	37
A. pleuropneumoniae	7	1
A. pleuropneumoniae	9-11	9
A. pleuropneumoniae	12	1
A. pleuropneumoniae	13	1
A. pleuropneumoniae	14	1
A. pleuropneumoniae	ND	2
Actinobacillus spp.	ND	1
A. rossii	-	3
A. suis	-	8
A. lignieresii	-	1

Tabella 1. Isolati batterici inclusi nello studio suddivisi per specie e sierotipo. *Table 1*. Bacterial isolates included in this study, classified by species and serotype. All'analisi multivariata esplorativa, sia PCA che LDA hanno mostrato un buon grado di suddivisione dei diversi sierotipi di APP (Figura 2), ed una netta suddivisione tra specie APP e non-APP (*A. Suis, A. lignieresii, A. rossii*).

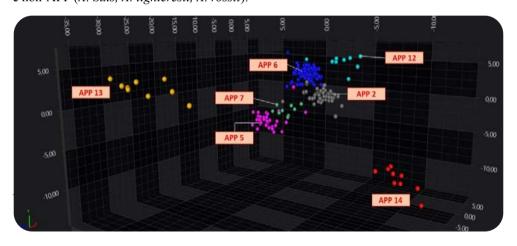


Figura 2. 3D Scatter Plot, analisi LDA. I cluster sono stati colorati in base al sierotipo: APP 2 (grigio), APP 5 (fucsia), APP 6 (blu), APP 7 (verde), APP 12 (azzurro), APP 13 (giallo), APP 14 (rosso).

Figure 2. 3D Scatter Plot, LDA analysis. Serotypes clusters are characterized as follow: APP 2 (grey), APP 5 (pink), APP 6 (blue), APP 7 (green), APP 12 (light blue), APP 13 (yellow), APP 14 (red).

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno evidenziato una buona suddivisione dei ceppi batterici di APP in base al sierotipo. Inoltre, è stato possibile differenziare anche ceppi APP da non-APP

(A. Suis, A. lignieresii, A. rossii), e l'isolamento dei sierotipi 6, 9-11,13,14 è stato riportato per la prima volta sul territorio piemontese.

Il monitoraggio epidemiologico dei vari sierotipi circolanti in territori ad elevata densità di allevamenti suini è fondamentale non solo per la prevenzione di nuovi focolai, ma anche per l'allestimento precoce di vaccini più efficaci e mirati al sierotipo target²⁶.

Ad oggi, la diagnosi di pleuropolmonite contagiosa è effettuata da una parte a seguito di sospetto clinico- anamnestico, dall'altra attraverso l'esame anatomopatologico che permette di evidenziare le lesioni tipiche polmonari, ma la conferma dell'agente eziologico avviene esclusivamente tramite isolamento batterico ed identificazione molecolare o fenotipica. Le metodiche adoperate per la sierotipizzazione sono invece quelle di amplificazione di alcune regioni di DNA specifiche per i vari sierotipi, e sono effettuate esclusivamente da laboratori specializzati e con costi relativamente alti³⁰⁻³².

L'utilizzo di una nuova metodica di sierotipizzazione più rapida e user-friendly è dunque cruciale per favorire l'intervento negli allevamenti colpiti da pleuropolmonite contagiosa in tempo reale, e promettente in termini di prevenzione vaccinale più mirata³³⁻³⁵.

I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato una buona clusterizzazione in particolar modo dei sierotipi 6 e 2, i più frequenti sul territorio piemontese. La numerosità campionaria più scarsa di altri sierotipi, come il 7,12,13,14 può invece rappresentare un limite nell'analisi di machine learning. Inoltre, sono state riscontrate delle difficoltà nella distinzione dei sierotipi 9 e 11 che non hanno permesso una suddivisione sufficiente a discriminare gli stessi, ed è stato pertanto ritenuto opportuno considerare i due sierotipi un'unica entità-cluster.

D'altra parte, è stata riscontrata una buona suddivisione tra specie diverse di *Actinobacillus* spp. (*A. Suis, A. lignieresii, A. rossii*), garantendo un risultato migliore rispetto a quello ottenuto nella routine tramite identificazione fenotipica su MALDI-TOF.

Infine, grazie a questo studio, l'IR-Biotyper è stato applicato per la prima volta come strumento diagnostico sperimentale nel settore suinicolo, e in generale in ambito veterinario, rappresentando quindi una tecnologia innovativa e promettente nel campo della sanità animale³⁸.

CONCLUSIONI

L'utilizzo di nuove tecnologie non basate sull'amplificazione di acidi nucleici per la sierotipizzazione di APP risulta vantaggiosa da numerosi punti di vista, tra cui: i) la rapidità dell'esame, ii) il costo relativamente contenuto, iii) la possibilità di fare diagnosi direttamente dalla colonia batterica isolata senza l'utilizzo di metodiche molecolari.

In futuro, sarà necessario implementare non solo il numero di ceppi batterici APP per rendere più robusta l'analisi di machine-learning, ma anche la multidisciplinarietà dell'approccio alla diagnosi di malattie respiratorie del suino lungo la filiera, dalla clinica all'esame anatomopatologico, dalla diagnosi molecolare fino all'utilizzo di tecnologie innovative come l'IR-biotyper.

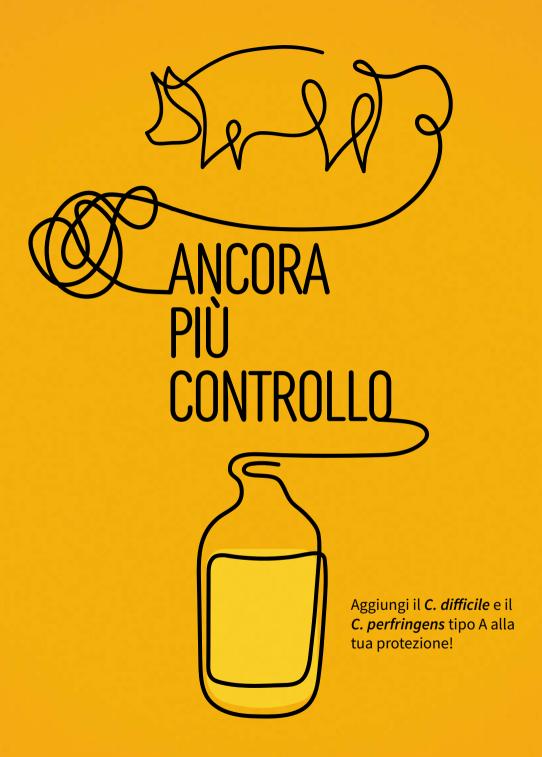
BIBLIOGRAFIA

- 1. Shope RE. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology, and pathology. J Exp Med. 1964;119(3):357-368. doi:10.1084/jem.119.3.357
- Pohl S, Bertschinger HU, Frederiksen W, Mannheim* W. Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pasteurella haemolytica-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. Int J Syst Evol Microbiol. 1983;33(3):510-514. doi:https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-510

- 3. Stringer OW, Li Y, Bossé JT, Langford PR. JMM Profile: Actinobacillus pleuropneumoniae: a major cause of lung disease in pigs but difficult to control and eradicate. J Med Microbiol. 2022;71(3). doi:10.1099/jmm.0.001483
- 4. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, et al. Actinobacillus pleuropneumoniae: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes Infect. 2002;4(2):225-235. doi:10.1016/s1286-4579(01)01534-9
- Stringer OW, Bossé JT, Lacouture S, et al. Proposal of Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars. Vet Microbiol. 2021;255:109021. doi:10.1016/j.vetmic.2021.109021
- 6. Helke KL, Ezell PC, Duran-Struuck R, Swindle MM. Biology and Diseases of Swine. Lab Anim Med. Published online 2015:695-769. doi:10.1016/B978-0-12-409527-4.00016-X
- 7. Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I. Update on Actinobacillus pleuropneumoniae-knowledge, gaps and challenges. Transbound Emerg Dis. 2018;65 Suppl 1:72-90. doi:10.1111/tbed.12739
- 8. Cohen LM, Grøntvedt CA, Klem TB, et al. A descriptive study of acute outbreaks of respiratory disease in Norwegian fattening pig herds. Acta Vet Scand. 2020;62(1):35. doi:10.1186/s13028-020-00529-z
- 9. Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Virulence factors of Actinobacillus pleuropneumoniae involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. Vet Res. 2010;41(5):65. doi:10.1051/vetres/2010037
- 10. Utrera V, Pijoan C. Fimbriae in A pleuropneumoniae strains isolated from pig respiratory tracts. Vet Rec. 1991;128(15):357-358. doi:10.1136/vr.128.15.357
- 11. Bélanger M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M. Role of lipopolysaccharides in adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae to porcine tracheal rings. Infect Immun. 1990;58(11):3523-3530. doi:10.1128/iai.58.11.3523-3530.1990
- 12. Abul-Milh M, Paradis SE, Dubreuil JD, Jacques M. Binding of Actinobacillus pleuropneumoniae lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. Infect Immun. 1999;67(10):4983-4987. doi:10.1128/IAI.67.10.4983-4987.1999
- 13. Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V, et al. Effects of growth conditions on biofilm formation by Actinobacillus pleuropneumoniae. Vet Res. 2010;41(1):3. doi:10.1051/vetres/2009051
- 14. Baltes N, Hennig-Pauka I, Gerlach G-F. Both transferrin binding proteins are virulence factors in Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 7 infection. FEMS Microbiol Lett. 2002;209(2):283-287. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11145.x
- 15. Archambault M, Rioux S, Jacques M. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of Actinobacillus pleuropneumoniae using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. FEMS Microbiol Lett. 1999;173(1):17-25. doi:10.1111/j.1574-6968.1999. tb13479.x
- Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S, et al. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis
 of Actinobacillus pleuropneumoniae infections, development and prevalidation of the
 ApxIV ELISA. Vet Microbiol. 2004;99(3-4):227-238. doi:10.1016/j.vetmic.2004.01.004
- 17. Schuwerk L, Hoeltig D, Waldmann K-H, Valentin-Weigand P, Rohde J. Sero- and apxtyping of German Actinobacillus pleuropneumoniae field isolates from 2010 to 2019 reveals a predominance of serovar 2 with regular apx-profile. Vet Res. 2021;52(1):10. doi:10.1186/s13567-020-00890-x
- 18. Gottschalk M, Lacouture S. Canada: Distribution of Streptococcus suis (from 2012 to 2014) and Actinobacillus pleuropneumoniae (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. Can Vet J = La Rev Vet Can. 2015;56(10):1093-1094.
- 19. Gottschalk M, Lacouture S. Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes 3, 6, 8 and 15

- isolated from diseased pigs in North America. Vet Rec. 2014;174(18):452. doi:https://doi.org/10.1136/vr.102470
- 20. Lacouture S, Gottschalk M. Distribution of Actinobacillus pleuropneumoniae (from 2015 to June 2020) and Glaesserella parasuis (from 2017 to June 2020) serotypes isolated from diseased pigs in Quebec. Can Vet J = La Rev Vet Can. 2020;61(12):1261-1263.
- 21. Li Y, Bossé JT, Williamson SM, et al. Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 8 predominates in England and Wales. Vet Rec. 2016;179(11):276. doi:10.1136/vr.103820
- 22. Sárközi R, Makrai L, Fodor L. Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes in Hungary. Acta Vet Hung. 2018;66(3):343-349. doi:10.1556/004.2018.031
- 23. Losinger WC. Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of Actinobacillus pleuropneumoniae on grower/finisher swine operations in the United States. Prev Vet Med. 2005;68(2-4):181-193. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.12.004
- 24. Hoflack G, Maes D, Mateusen B, Verdonck M, de Kruif A. Efficacy of tilmicosin phosphate (Pulmotil premix) in feed for the treatment of a clinical outbreak of Actinobacillus pleuropneumoniae infection in growing-finishing pigs. J Vet Med B, Infect Dis Vet public Heal. 2001;48(9):655-664. doi:10.1046/j.1439-0450.2001.00492.x
- 25. Holmgren N, Lundeheim N, Wallgren P. Infections with Mycoplasma hyopneumoniae and Actinobacillus pleuropneumoniae in fattening pigs. Influence of piglet production systems and influence on production parameters. Zentralblatt fur Vet R B J Vet Med Ser B. 1999;46(8):535-544. doi:10.1111/j.1439-0450.1999.tb01246.x
- 26. Gale C, Velazquez E. Actinobacillus pleuropneumoniae: a review of an economically important pathogen. Livestock. 2020;25(6):308-314. doi:10.12968/live.2020.25.6.308
- 27. Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M. Actinobacillus pleuropneumoniae surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. Anim Heal Res Rev. 2000;1(2):73-93. doi:10.1017/s1466252300000074
- 28. Hennessy KJ, Iandolo JJ, Fenwick BW. Serotype identification of Actinobacillus pleuropneumoniae by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993;31(5):1155-1159. doi:10.1128/jcm.31.5.1155-1159.1993
- 29. Gottschalk M. The challenge of detecting herds sub-clinically infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. Vet J. 2015;206(1):30-38. doi:10.1016/j.tvjl.2015.06.016
- 30. Schuchert JA, Inzana TJ, Angen Ø, Jessing S. Detection and identification of Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004;42(9):4344-4348. doi:10.1128/JCM.42.9.4344-4348.2004
- 31. Angen O, Ahrens P, Jessing SG. Development of a multiplex PCR test for identification of Actinobacillus pleuropneumoniae serovars 1, 7, and 12. Vet Microbiol. 2008;132(3-4):312-318. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.010
- 32. Bossé JT, Li Y, Fernandez Crespo R, et al. Comparative sequence analysis of the capsular polysaccharide loci of Actinobacillus pleuropneumoniae serovars 1-18, and development of two multiplex PCRs for comprehensive capsule typing. Vet Microbiol. 2018;220:83-89. doi:10.1016/j.vetmic.2018.05.011
- 33. Frey J, Beck M, van den Bosch JF, Segers RP, Nicolet J. Development of an efficient PCR method for toxin typing of Actinobacillus pleuropneumoniae strains. Mol Cell Probes. 1995;9(4):277-282. doi:10.1016/s0890-8508(95)90158-2
- 34. Gram T, Ahrens P, Andreasen M, Nielsen JP. An Actinobacillus pleuropneumoniae PCR typing system based on the apx and omlA genes--evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. Vet Microbiol. 2000;75(1):43-57. doi:10.1016/s0378-1135(00)00206-6
- 35. Osaki M, Sato Y, Tomura H, Ito H, Sekizaki T. Genetic diversity of the genes encoding the outer membrane lipoprotein (omlA) of Actinobacillus pleuropneumoniae. J Vet Med Sci. 1997;59(3):213-215. doi:10.1292/jvms.59.213

- 36. Zhou L, Jones SCP, Angen Ø, et al. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 Actinobacillus pleuropneumoniae strains. J Clin Microbiol. 2008;46(2):800-803. doi:10.1128/JCM.01787-07
- 37. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. Nat Protoc. 2014;9(8):1771-1791. doi:10.1038/nprot.2014.110
- 38. Cordovana M, Mauder N, Kostrzewa M, et al. Classification of Salmonella enterica of the (Para-)Typhoid Fever Group by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Microorganisms. 2021;9(4). doi:10.3390/microorganisms9040853
- 39. Cordovana M, Mauder N, Join-Lambert O, et al. Machine learning-based typing of Salmonella enterica O-serogroups by the Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy-based IR Biotyper system. J Microbiol Methods. 2022;201:106564. doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106564
- 40. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature. 1991;351(6321):81-82. doi:10.1038/351081a0
- 41. Bruker Daltonics GmbH % Co. KG. IR Biotyper User Manual. Revision C.(December 2021), Doc. no. 5025119.





Soluzioni su misura per incrementare la vostra produttività con la massima protezione



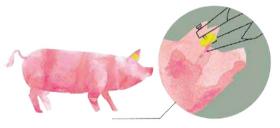
Scopri come possiamo supportare la tua attività su: kemin.com/veterinary-solutions





LeeO è uno strumento utile ad allevatori, ricercatori e trasformatori delle carni.

LeeO registra e mantiene tutti gli eventi significativi del ciclo di allevamento, rendendo connesse tutte le fasi del ciclo produttivo.



www.leeo.eu tecnologiasuini@msd.com









Via Brescia, 37/A | 25014 Castenedolo (BS) Italy 030 7870410 | info@jrsitalia.com

JRS RETTENMAIER ITALIA

www.jrsitalia.com



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









Chi ricerca, trova.



vetagro.com



Inquadra il codice per guardare il nostro video corporate.











ZOETIS SI IMPEGNA AD ACCRESCERE LA SOSTENIBILITÀ

della produzione di carne suina, proponendo soluzioni innovative per una alimentazione sicura, di qualità e responsabile. Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS per il 2023 si svolgono con il contributo non condizionato di



































SEGRETERIA DELEGATA SIPAS



Via Marchesi 26 D - 43126 Parma (Italy) Tel. +39 0521 290191 Fax +39 0521 291314 sipas@mvcongressi.it