SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

XLIX MEETING ANNUALE

Desenzano (BS)

18/19 Aprile 2024

Palace Hotel Desenzano

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2024

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

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

ISBN 978-88-943304-2-7

INDICE

Prefazione ..... p. 19

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

STREPTOCOCCOSI NEL SUINO: ESPERIENZE A CONFRONTO

Parma, 13 Ottobre 2023

LE INFEZIONI DA *STREPTOCOCCUS SUIS* NEL SUINO: STORIA, ATTUALITÀ E PROSPETTIVE POSSIBILI
Vittorio Sala ..... p. 21

STREPTOCOCCOSI: L'ESPERIENZA OLANDESE
Tijs Tobias ..... p. 27

POSSIBILI STRATEGIE NUTRIZIONALI PER CONTROLLARE LE INFEZIONI DA STREPTOCOCCO NEI SUINETTI SVEZZATI
Jan Dirk Van der Klis ..... p. 35

STREPTOCOCCUS SUIS IN ITALIA: ASPETTI EPIDEMIOLOGICI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA
Francesca Romana Massacci ..... p. 43

IMPIEGO DELLA VACCINAZIONE NEL CONTROLLO DELLA STREPTOCOCCOSI DEL SUINO: ESPERIENZE DI CAMPO
Fausto Vezzoli ..... p. 49

ATTI DEL XLIX MEETING ANNUALE

Desenzano (BS), 18-19 Aprile 2024

UTILIZZO DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI E ALTRE MATRICI ALTERNATIVE PER IL MONITORAGGIO DEL VIRUS DELLA PRRS
Martina Ustulin ..... p. 53

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL *NEXT-GENERATION SEQUENCING* DI PRRSV DA UN PUNTO DI VISTA EPIDEMIOLOGICO
Giovanni Trevisan ..... p. 59

PESTE SUINA AFRICANA IN LOMBARDIA: FATTORI DI RISCHIO E MODALITÀ DI DIFFUSIONE NEL SUINO
Silvia Bellini ..... p. 64

LA BIOSICUREZZA UNA PRATICA INDISPENSABILE PER LA SUINICOLTURA SOSTENIBILE
Adrian Balaban ..... p. 66

PESTE SUINA AFRICANA IN EUROPA E IN ITALIA: AGGIORNAMENTI EPIDEMIOLOGICI
Carmen Iscaro ..... p. 67

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CLUSTER ITALIANI DI PSA NELL'ONDATA EPIDEMICA 2022-2023
Monica Giammarioli ..... p. 73

SFIDE E TENDENZE DELLA SUINICOLTURA A LIVELLO GLOBALE
Vincent Ter Beek ..... p. 76

LA BIOSICUREZZA UNA PRATICA INDISPENSABILE PER LA SUINICOLTURA SOSTENIBILE
Antonio Caleffi ..... p. 79

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

APPROCCIO INTEGRATO PER LA SELEZIONE DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS SUIS* PER L'ALLESTIMENTO DI VACCINO STABULOGENO E VALUTAZIONE DELLA DINAMICA DELLE POPOLAZIONI CIRCOLANTI IN ALLEVAMENTI COMMERCIALI
Cordioli B., Bacchin C., Drigo I., Garbuio M., Alborali G.l., Tonni M., Guarneri F., Vio D., Ustulin M., Zoppi S., Tonon F., Bano L. ..... p. 82

MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING, UN VALIDO STRUMENTO PER COMPRENDERE LA DIFFUSIONE DI *MYCOPLASMA HYORHINIS*
Nai G., Righetti V., Stefani E., Gastaldelli M., Tondo A., Prataviera D. , Colò B., Rossi I., Vio D., Merenda M. ..... p. 89

RESISTENZA EMERGENTE AL FLORFENICOLO IN ISOLATI DI ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE DA UN ALLEVAMENTO SUINO ITALIANO
Massacci F.R., Cucco L., Ustulin M., Albini E., Paniccià M., Vio D., Cinthi M., Coccitto S.N., Giovanetti E., Brenciani A., Magistrali C.F. ..... p. 99

CONFRONTO DEI PROFILI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA E SENSIBILITÀ AI DISINFETTANTI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA ALLEVAMENTI SUINI DEL REGNO UNITO
Bortolami L., Cawthraw, S., Ostanello F., Martelli F. ..... p. 109

VIRUS INFLUENZALI SUINI NEL NORD ITALIA. STUDIO DELLE FORME EPIZOOTICHE ED ENZOOTICHE NEGLI ALLEVAMENTI
Chiapponi C., Prosperi A., Soliani L., Baioni L., Zanni I., Calanchi I., Torreggiani C., Moreno A., Alborali L., Faccini S., Rosignoli C., Bonilauri P., Pupillo G., Fiorentini L., Tosi G., Luppi A. ..... p. 122

IMPIEGO DI FITOPRODOTTI IN COMPARAZIONE A ZNO FARMACOLOGICO COME STRATEGIA PER SOSTENERE LA SALUTE INTESTINALE DEI SUINI IN SVEZZAMENTO
Trevisi P., Correa F., Negrini C., Virdis S., Del Zozzo F., Mazzoni M., Luise D. ..... p. 132

UTILIZZO DELLA FARINA DI INSETTI NELL'ALIMENTAZIONE DEI SUINETTI IN POST-SVEZZAMENTO: VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE E DELLA DIGERIBILITÀ DEI NUTRIENTI
Faccenda M., Biasato I., Cornale P., Badino P., Odore R., Gerbino E., Conte V., Bellezza Oddon S., Resconi A., Gasco L. ..... p. 143

EFFETTO DELLA PARZIALE SOSTITUZIONE DELLA SOIA E DELLA RIDUZIONE DELLA QUOTA PROTEICA SULLE PERFORMANCE DI SUINI NELLA FASE D'INGRASSO
Graziosi M.V., Luise D., Soglia F., Correa F., Virdis S., Negrini C., Palumbo F., Cau F., Sereni M., Rolla U., Biagi G., Petracci M., Trevisi P. ..... p. 150

LA BANDA PENTASETTIMANALE: UNA TERAPIA MANAGERIALE
Mazzoni C., Scollo A. ..... p. 160

I FEROMONI: DALLA BIOLOGIA ALLE APPLICAZIONI PER GARANTIRE IL BENESSERE E LA PRODUTTIVITÀ DEL SUINO DOMESTICO
Reati E., Canelli E. ..... p. 170

POLMONITE SUINA: LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO QUALE AUSILIO ALLA DIAGNOSI ANATOMOPATOLOGICA
Recchia M., Varra' M.O., Formenti N., Tonni M., Maisano A.M., Zanardi E., Conter M., Ghidini S., Ianieri A., Alborali G.L. ..... p. 179

VERIFICA DELL'ERUZIONE DENTALE NEI SUINETTI ALLO SVEZZAMENTO: POSSIBILI INDICATORI DI BENESSERE ANIMALE
Raineri S., Gazzola A., Vezzoli F., Arioli E., Santucci V.U., Castelluccio D., Santucci G., Tonni M., Scali F., Lorenzi V., Alborali G.L., Maisano A.M. ..... p. 186

LA GESTIONE DELLE SCROFE GRAVIDE ALL'IMBRANCAMENTO: IMPLICAZIONI PER IL BENESSERE ANIMALE E LE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE
Galli M.C. ..... p. 195

POSTER

CONFRONTO TRA OSSIDO DI ZINCO FARMACOLOGICO E UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI COMPOSTI BOTANICI SU PERFORMANCE E TRATTAMENTI MEDICALI IN SUINETTI ALLO SVEZZAMENTO
Bonetti A., Tugnoli B., Piva A., Corino C., Rossi R., Grilli E. ..... p. 203

PUNTEGGIATURA DELLE MACCHIE BIANCHE DA *ASCARIS SUUM* MEDIANTE INTELLIGENZA ARTIFICIALE: DATI PRELIMINARI
Hattab J., Porrello A., Rosamilia A., Romano A., Bernabo' N., Capobianco Dondona A., Ferrari L., Sganzerla J., Bernardi M., Lo Presti G., Corradi A., Marruchella G. ..... p. 211

LESIONI AURICOLARI NEI SUINI AL MACELLO: INDAGINI PRELIMINARI MEDIANTE STRUMENTI *OPEN SOURCE* DI INTELLIGENZA ARTIFICIALE
D'angelo M., Cecchini C., Guarnieri C., Sciota D., Hattab J., Rosamilia A., Olivastri A., Marruchella G. ..... p. 217

SIEROTIPIZZAZIONE DEI CEPPI DI GLAESSERELLA PARASUIS ISOLATI IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA NEL PERIODO 2013-2023
Pupillo G., Bariselli S., Zuliani R., Gherpelli Y., De Lorenzi G., Dottori M. ..... p. 221

CIRCLES EU PROJECT: RIDUZIONE DELLE EMISSIONI DELL'ALLEVAMENTO DEL SUINO ALL'INGRASSO ATTRAVERSO IL TRATTAMENTO DEI LIQUAMI IN STALLA CON DIVERSI BIOATTIVATORI
Trevisi P., Correa F., Secchi N., Graziosi M.V., Virdis S., Luise D. ..... p. 229

EFFETTO DEI β-1,3-GLUCANI SUL COLOSTRO, SULLA QUALITÀ DELLA NUTRIZIONE DEI SUINI E SULLA SALUTE IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE IPERPROLIFICHE
Neto R., Mattuzzi S., Casiro S., Bukowska P, Wealleans A., Van Hamme V. ..... p. 236

PRINCIPALI ENDOPARASSITI DEI SUINI DA INGRASSO E FATTORI DI RISCHIO ASSOCIATI IN NORD ITALIA
Allievi C., Valleri M., Zanzani S.A., Zanon A., Mortarino M., Manfredi M.T. ..... p. 244

CASO CLINICO: EPISODI DI ACTINOBACILLOSI DA ACTINOBACILLUS SUIS IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DA INGRASSO IN PROVINCIA DI RAVENNA
Perulli S., Fiorentini L., Luppi A., Siclari C., Tattini A., Cirasella L., Taddei R., Tosi G. ..... p. 253

AGGIORNAMENTO SULLA PREVALENZA DEI VIROTIPI ISOLATI IN FOCOLAI DI COLIBACILLOSI ENTERICA POST SVEZZAMENTO IN ITALIA
Torreggiani C., Prosperi A., Chiapponi C., Manfredi R., Baioni L., Pupillo G., De Lorenzi G., Rugna G., Bassi P., Tonni M., Maisano., Luppi A. ..... p. 258

TRATTAMENTO ANTIELMINTICO DEL SUINO MEDIANTE SOMMINISTRAZIONE CONTINUATIVA (h24) DI FLUBENDAZOLO IN ACQUA DA BERE: RISULTATI PRELIMINARI
De Jong S., Engelen B., Guarini C.P.B., Cevidalli A.E. ..... p. 263

VALUTAZIONE DELLE PROCEDURE DI PULIZIA E DISINFEZIONE NELL'ALLEVAMENTO SUINICOLO MEDIANTE L'UTILIZZO DI BIOMARCATORI AMBIENTALI
Novara R., Mei D., Vincenti V., Pinnelli V., Scollo A. ..... p. 269

LA GESTIONE DELLE SCROFE IN BOX APERTI. QUALI CONSEGUENZE PER I SUINETTI?
Moscon E., Gottardo F., Tonon F. ..... p. 279

EFFETTO DELLA NUMEROSITÀ DEL GRUPPO SULLE MORSICATURE E SULLE PRESTAZIONI RIPRODUTTIVE DI SCROFE IN GESTAZIONE
Pinzano A., Gottardo F., Tonon F. ..... p. 287

USO DEGLI ARRICCHIMENTI AMBIENTALI COME MEZZO DI RIDUZIONE DI COMPORTAMENTI ANOMALI E LESIONI TRA SUINI NON CAUDECTOMIZZATI NELL'ALLEVAMENTO ALL'INGRASSO ITALIANO
Favaro D., Contiero B., Gottardo F., Scollo A., Tonon F. ..... p. 297

INQUADRAMENTO EPIDEMIOLOGICO DELLA PESTE SUINA AFRICANA: NUOVO PERICOLO SANITARIO
Tedeschi I. ..... p. 304

PATTERN DI DISTRIBUZIONE CELLULARE IN LINFADENOPATIE DEL SUINO
D'annunzio G., Muscatello L. V., Luppi A., Fiorentino M., Franceschini T., Grillini A., Rugna G., Sarli G., Mandrioli L. ..... p. 315

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2024

VINCITORE

UNA CATTIVA DISINFEZIONE DEGLI AMBIENTI NELL'ALLEVAMENTO SUINO PUO' PREDISPORRE ALLA PERSISTENZA DELL' ANTIMICROBICORESISTENZA?
Vincenti V., Marra C., Novara R., Caruso C., Zoppi S., Scollo A. ..... p. 327

PREMIO CASIMIRO TAROCCO 2024
VINCITORE

ADDITIVI FUNZIONALI PER LA SALUTE ANIMALE
Dell'Anno M., Rossi L. ..... p. 342

PREMIO FORMAZIONE PROFESSIONALE ITALIA 2023

VACCINO VIVO PER E. COLI F4/F18 CASO CLINICO: EFFICACIA DEL VACCINO VALUTATA IN TERMINI DI RIDUZIONE DI CONSUMO DI ANTIBIOTICI E DI STREPTOCOCCOSI
Grapelli F. ..... p. 353

PREMIO FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2023

BENESSERE DELLA SCROFA O SICUREZZA DEL SUINETTO? COME LA PLF PUÒ AIUTARE A RISOLVERE IL DILEMMA
Menegon F., Gan H., Leone L., Puggioni A., Galli M.C., Perrucci A., Di Martino G., Norton T., Scollo A. ..... p. 359

PROTOCOLLI PER IL MONITORAGGIO E CONTROLLO AMBIENTALE NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI
Urbani R. ..... p. 366

VALUTAZIONE SEMI-QUANTITATIVA DELL'IMPATTO DELLA PESTE SUINA AFRICANA SUGLI ALLEVATORI DI PICCOLA SCALA IN BULGARIA: IL CASO DEL SUINO NERO DEI BALCANI ORIENTALI
Lazzaro E., Dimitrova D., Doneva R., Guardone L., Cristalli A., Crovato S., Angeloni G. ..... p. 374

ISOLAMENTO VIRALE DI PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 GENOTIPO -2E: UN PRIMO TENTATIVO
Faustini G., Llorens A.M., Sibila M., Segalés J. , Franzo G. ..... p. 385

Materiale riservato al Medico Veterinario e all'Allevatore Professionista. Se sei un allevatore professionista chiedi informazioni al Medico Veterinario.

FLEX RESPIRATORY

FLEX REPRODUCTIVE

Il suo benessere è nelle tue mani

Boehringer Ingelheim

Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A. www.boehringer-ingelheim.it - Tel: 0253551

Insieme, oltre la salute animale

chemifarma®

CON LA **PESTE SUINA** NON SI SCHERZA

LINEA BIOSICUREZZA

PRESIDI CERTIFICATI

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

Per maggiori informazioni sui **BIOCIDI CHEMIFARMA** testati efficacemente contro la peste suina:

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

info@matridigital.it

maggiori informazioni e materiali didattici su Dechra Academy o su **www.dechra.it**

Produzione e commercializzazione
di farmaci veterinari in tutto il mondo.

Dal 2014 presente anche in Italia.

PRESENTI
A SIPAS 2024

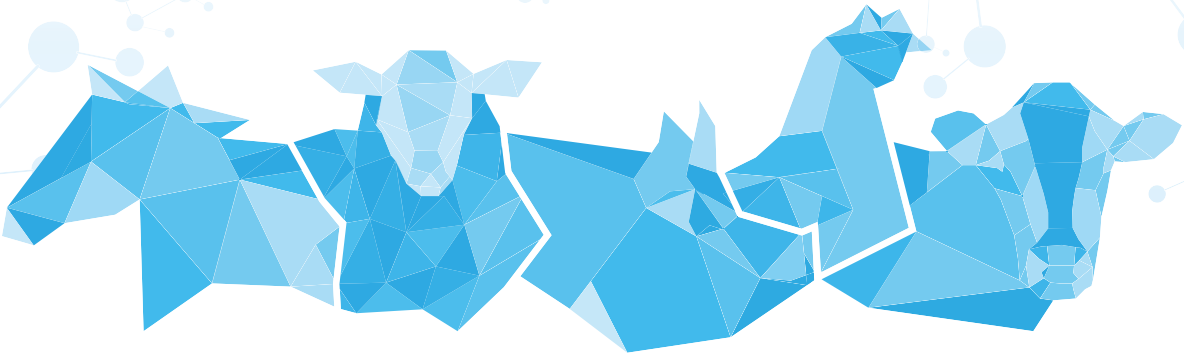
18/19 APRILE
PALACE HOTEL - DESENZANO (BS)

© Dechra Veterinary Products
Via Agostino da Montefeltro 2
10134 TORINO - ITALIA
Tel. +39 0113157437

info.it@dechra.com

Dechra

Dopharma
Italia



The smart choice for healthy livestock

IL NOSTRO IMPEGNO

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

info@dopharma.it • www.dopharma.it

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

Sinergie per un perfetto equilibrio

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

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

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

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

dox-al
Hi-tech
Pharma
Care
Nutri

Vuoi migliorare salute, benessere e produttività dei tuoi suinetti con meno trattamenti antibiotici e senza ossido di zinco?

SI PUÒ FARE!

PROTEGGI I TUOI SUINETTI IN MODO SOSTENIBILE!

Per sostenerti nella difficile sfida contro la **Diarrea Post Svezzamento da *E. Coli* ETEC** e aiutarti a gestire in modo efficace questo periodo di transizione, **Elanco** mette a disposizione servizi diagnostici e supporto vaccinale così che i tuoi suinetti possano essere svezzati con tutta la protezione di cui hanno bisogno.

Per maggiori informazioni
contatta il tuo rappresentante Elanco di fiducia

Elanco e la barra diagonale sono marchi registrati di Elanco o sue affiliate. Materiale riservato ai Medici Veterinari ©2023 Elanco. PM-IT-23-0022
Elanco Italia S.p.A. – Via dei Colatori 12, 50019 Sesto Fiorentino (FI)

la Salute Animale per la Salute dell'Uomo

ONE HEALTH
ECO HEALTH

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

LA SALUTE ANIMALE PER LA SALUTE DELL'UOMO
FATRO

PREFAZIONE

Cari Soci,

a nome del Consiglio Direttivo, sono lieto di accogliervi al 49° Meeting Annuale di SIPAS. Come da tradizione, il volume degli atti si apre con una prefazione e quest'anno tocca a me. Rileggendo le parole di chi mi ha preceduto mi rendo conto di quanto anche il nostro sia un mondo in continua evoluzione dove, l'unica via per sopravvivere è abbracciare il cambiamento ed evolversi con esso. È con questo spirito che SIPAS ha contribuito e continua a contribuire alla suinicoltura italiana.

Se dal punto di vista economico il 2023 ha confermato le attese, con il calo dei prezzi delle materie prime che ha portato a una progressiva riduzione dei costi di produzione e un valore di mercato del suino grasso sostanzialmente stabile, lo stesso non si può dire per l'aspetto sanitario.

Il 29 agosto, la conferma del primo focolaio di PSA in un allevamento commerciale in provincia di Pavia ha sconvolto il panorama suinicolo italiano. Gli allevatori pavesi hanno dovuto affrontare l'abbattimento di decine di migliaia di capi, la gestione di zone di restrizione con vincoli alla movimentazione e il deprezzamento dei loro animali. Le regioni limitrofe hanno sopperito alla necesssità di implementare misure di biosicurezza rafforzata, con una costante attenzione alla difesa dei loro allevamenti da una patologia che rischia l'endemizzazione, con le possibili devastanti ripercussioni economiche note a tutti. A ciò si aggiunge la circolazione di ceppi di PRRSv ad alta virulenza, sempre più diffusi nel nostro paese. Anche quest'anno SIPAS ritiene importante mantenere alta l'attenzione su questi aspetti prevedendo due tavole rotonde dedicate.

Allevatori e veterinari si trovano nella difficile posizione di lavorare incessantemente per garantire un alto livello di benessere agli animali e la salubrità dei prodotti derivati, riducendo al tempo stesso l'impiego di farmaci antimicrobici.

In questo contesto di sfide e cambiamenti, la formazione, l'informazione e, aggiungerei, l'informatizzazione assumono un ruolo chiave. Questi permettono di comprendere i fattori che regolano i fenomeni produttivi e ci forniscono gli strumenti per governarli. Per quanto concerne la formazione continua offerta da SIPAS, come negli anni precedenti, la società sostiene i giovani laureati con strumenti come i premi Guadagnini e Tarocco e le borse per soggiorni formativi in Italia e all'estero.

Guardando al futuro, sono convinto che tecnologie che si stanno affermando sempre più in altri settori, come *l'Internet of Things (IoT)*, i *Big Data* e il *Machine Learning*, avranno un ruolo sempre più importante nel raggiungimento degli obiettivi di sostenibilità e resilienza dell'intera filiera suinicola e auspico che, anche SIPAS, riesca a dedicare più spazio alla condivisione delle potenzialità di questi strumenti, negli anni a venire. Altrettanto fondamentale è la necessità di fare fronte comune a queste sfide, condividendo informazioni ed esperienze. Per questo motivo SIPAS ha deciso quest'anno di estendere il meeting annuale a due giornate intere, rivedendo la storica formula, per dare più spazio al confronto ed ai Vostri contributi scientifici.
Concludo porgendo i miei più sentiti ringraziamenti alla Segreteria Delegata agli Sponsor e a tutti Voi, cari Soci per il contributo che continuate a dare alla crescita della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini.

Vi auguro un proficuo Meeting, ricco di spunti di riflessione e di confronto costruttivo.

Mirco Dalla Bona

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

STREPTOCOCCOSI NEL SUINO: ESPERIENZE A CONFRONTO

Parma, 13 Ottobre 2023

LE INFEZIONI DA *STREPTOCOCCUS SUIS* NEL SUINO: STORIA, ATTUALITÀ E PROSPETTIVE

SALA V.

Ordinario di Malattie Infettive degli Animali domestici

Pur avendo modificato le loro caratteristiche epidemiologiche e cliniche, a quasi settant'anni dalla prima segnalazione, le patologie indotte da *Streptococcus suis* nella produzione suinicola rimangono un problema sanitario difficilmente gestibile e seriamente interferente sul benessere degli animali e sui costi di produzione.

Biologia di *Streptococcus suis*

In base alla struttura antigenica del polisaccaride capsulare (CPS), sono stati lungamente riconosciuti 35 sierotipi e per ciascuno è stato stabilito un ceppo di riferimento, isolato da forme cliniche nel suino e/o nell'uomo.

Successivamente, analisi filogenetiche più approfondite hanno portato alla classificazione come *Streptococcus orisratti* dei sierotipi 32 e 34 e, più recentemente, attraverso il sequenziamento genomico, sono stati rimossi anche i sierotipi 20, 22, 26, per i quali è stata proposta la nuova specie *Streptococcus parasuis*, oltre al sierotipo 33.

Attualmente, gran parte degli isolamenti da forme cliniche riferisce ai sierotipi da 1 a 9, 1/2 e 14, pur con distribuzioni geograficamente differenti; i sierotipi 2, 3 e 9 predominano in Europa e in Asia mentre in Nord America prevalgono 1/2, 2, 3, 4, 7 e 8. È frequente anche l'isolamento di ceppi non tipizzabili, in quanto privi di capsula e quindi non reattivi alla sierotipizzazione, oppure con mutazioni genomiche non riconoscibili dai primer disponibili.

In Italia, il sierotipo 2 fu isolato per la prima volta nel 1985 dal gruppo di ricerca dell'allora Istituto di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano, da forme cliniche acute di meningite e setticemia dei suinetti, sotto la responsabilità di Sala; in precedenza, solo Zavanella dell'IZSLER ne aveva dimostrata la presenza in carcasse di suini al macello.

Permanenza e diffusione

La presenza di *Streptococcus suis* nel comparto orofaringeo è frequente nei suini di tutte le età, ma suinetti già infetti al parto possono derivare anche da una localizzazione vaginale nelle scrofe primipare; in vita, la trasmissione avviene principalmente per contatto diretto oro-nasale, tra le scrofe e i suinetti in sala parto e nei gruppi di svezzamento, seguita dalla localizzazione primaria nelle tonsille palatine, che è più frequente tra 4 e 10 settimane di vita e può durare oltre un anno, anche dopo la risposta immunitaria.

Prevalenza d'infezione, morbilità e mortalità variano nelle singole realtà produttive, dove la morbilità può raggiungere il 50%, anche se molto raramente supera il 5%, con casi isolati nelle prime settimane di vita; il rischio maggiore è tra le 4 e le 12 settimane di vita, mentre il picco clinico si osserva in svezzamento a 5-6 settimane di vita, dopo l'esaurimento dell'immunità materna. Successivamente decresce la recettività, ma sono state segnalate forme cliniche acute anche dopo la messa a terra, fino a 150 giorni di vita e occasionalmente anche oltre.

La mortalità può arrivare al 20%, ma l'intervento terapeutico mirato e tempestivo la riduce drasticamente; la fase di maggiore circolazione è quella del rimescolamento a inizio svezzamento, dove tanto il condizionamento ambientale e gestionale, quanto le infezioni virali concomitanti, possono amplificare l'impatto clinico

È da ricordare il possibile ruolo delle mosche nel mantenimento e nella diffusione interaziendale dell'infezione, considerato che possono mantenere *S. suis* in condizioni d'infettività per 4-5 giorni, mentre i topi s'infettano per via ingestiva, trasmettendo ai loro simili e ai suini; è stata dimostrata l'infettività degli aghi multiuso, così come quella di calzature e vestiario contaminati dalle feci. Come tutti i batteri Gram positivi, anche S. suis ha una buona sopravvivenza all'essiccamento e ciò favorisce la sua diffusione attraverso il pulviscolato ambientale.
Nel periparto, le cariche infettanti provengono dalla saliva delle scrofe con localizzazione tonsillare, ma nelle primipare è frequente anche una localizzazione transitoria nella mucosa vaginale, che causa l'infezione intraparto dei nascituri.
Inoltre, situazioni ambientali e scelte gestionali favoriscono permanenza e diffusione interanimale dove l'affollamento è maggiore, con forme cliniche acute e croniche nelle fasi più condizionate; il progressivo adattamento di *Streptococcus suis* ha determinato l'estensione della meningite oltre la fase di svezzamento, fino al magronaggio inoltrato e generato un aumento degli scarti di produzione, sistematicamente portatori-eliminatori.

Infezione e forme cliniche
Nei suini di tutte le età, l'infezione avviene attraverso le tonsille palatine, che sono anche il primo sito di replicazione, dal quale origina una batteriemia, con i monociti infetti che raggiungono tutti gli organi e gli apparati; in questa forma avviene il superamento delle barriere, come quelle cefalorachidiana e articolare, impossibile per i batteri in forma libera.
Nella patogenesi della meningite, la flogosi determina l'iperproduzione di liquido cefalo-rachidiano (LCR), l'aumento della pressione endocranica con ipossia, la necrosi di alcune aree della corteccia, il danno neurale e la sintomatologia nervosa; nelle articolazioni, invece, dopo una fase iniziale nella quale lo streptococco è libero nel lume articolare, aderisce alle membrane sinoviali, vi penetra e replica nelle cellule che la costituiscono.
La morte per meningite avviene entro poche ore dalle prime manifestazioni, non sempre evidenti o riconosciute: è perciò frequente il ritrovamento di animali morti, nei quali le lesioni macroscopiche sono inapparenti, a meno che non si proceda a una laboriosa apertura della scatola cranica; la febbre (fino a 42°C) è presente in tutte le forme cliniche. Nell'artrite, la zoppia è il sintomo principale, mentre nella malattia setticemica (e nell'aborto se sono colpite scrofe gravide) l'evidenza più caratteristica è l'esantema.
In tutti i casi, è determinante lo stress d'adattamento al condizionamento ambientale e manageriale, con l'iperproduzione di glicocorticoidi ad attività immunosoppressiva; un'azione simile può essere svolta dai virus immunodepressogeni, come l'*Arterivirus* della PRRS.

Controllo e prevenzione
L'incidenza clinica è variabile, in rapporto alla frequenza dell'infezione e alla presenza dei fattori condizionanti, il che rende complicato il controllo e del tutto impossibile l'eradicazione: interventi mirati possono dare risultati transitori, ma una soluzione stabile può passare solo attraverso la riduzione della prevalenza dell'infezione nel parco scrofe: tra l'altro, reperire materiale da rimonta indenne è praticamente impossibile.
Non esistono vaccini pienamente efficaci e la mancanza di un antigene comune a tutti i sierotipi impedisce l'impiego del soma batterico per la vaccinazione; anche con i vaccini stabulogeni i risultati sono incostanti: difficilmente in allevamento un sierotipo è prevalente e l'immunizzazione mirata può favorire l'emersione di altri, mentre l'inserimento di più valenze nel vaccino ne riduce l'efficacia.
Gli antibiotici sono stati lungamente impiegati per controllare le infezioni da *S. suis* e hanno

indubbiamente salvato migliaia di suini e anche vite umane; tuttavia, la loro efficacia è progressivamente diminuita e in tutto il mondo sono stati segnalati tassi elevati di resistenza antimicrobica, superiore all'80% per lincosamidi, macrolidi e tetracicline.
Sarebbe perciò necessario disporre di alternative agli antibiotici convenzionali, ma la progressione delle resistenze rappresenta un motivo di scarso interesse economico per le aziende farmaceutiche, sempre meno disposte a investire nello sviluppo di nuove molecole; allo stato dei fatti, le possibilità di controllo sono legate all'impiego degli antibiotici β-lattamici, considerando comunque che le MIC sono consistentemente aumentate dopo la registrazione e l'applicazione non sempre corretta delle pre-miscele.

Gli interventi sulla gestione

Se le patologie da *Streptococcus suis* sono l'esempio più tipico di malattia condizionata in suinicoltura, garantire la qualità del management non può che essere la migliore e più efficace azione preventiva: la gestione attenta del pareggiamento fra le figliate, della formazione dei gruppi di svezzamento, dei flussi e delle densità in tutte le fasi, sono alla base di qualsiasi intervento; altre soluzioni possono essere la riduzione del rimescolamento negli spostamenti, l'attenzione al microclima e l'adozione del sistema di allevamento in bande.
In sala parto, ad esempio, il pareggiamento "separato" dei suinetti delle primipare è una soluzione efficace, perché tra questi è più frequente l'infezione; in seguito, la coabitazione tra gruppi di suini di età eccessivamente disomogenea, aumenta di molto il rischio di contagio.
Riguardo all'eradicazione, si può affermare senza tema di smentita la sua irrealizzabilità, almeno negli allevamenti intensivi della suinicoltura moderna: non si sono dimostrati efficaci i programmi di depopolamento e ripopolamento, mentre non esiste un sistema certo per riconoscere i soggetti portatori all'ingresso in allevamento; inoltre, nessun produttore di genetica femminile è, in questo momento, in grado di fornire scrofette da rimonta certificate indenni da *S. suis*.
Le uniche possibilità di controllo sono perciò legate al miglioramento del management e delle conoscenze delle dinamiche dell'infezione in allevamento; l'individuazione precoce dei sintomi attraverso l'osservazione programmata dei suini e la rimozione dei soggetti clinici, riduce le cariche infettanti e ne facilita il recupero produttivo.
Il trattamento individuale prevede tre livelli d'intervento: la somministrazione parenterale di antibiotico, l'impiego di antinfiammatori per ridurre l'ipertermia e l'edema e infine la reidratazione; ove fosse possibile una terapia di gruppo *per os,* è necessario valutare con attenzione la qualità "industriale" della molecola utilizzata, considerata la rapida degradabilità dei β-lattamici a contatto con l'aria e le interferenze di tipo chimico-fisico con l'alimento.
Il condizionamento manageriale rimane, tuttavia e di fatto, il vero determinante la gravità del problema: perciò, individuare e verificare i fattori di amplificazione nella circolazione dell'infezione può modularne incidenza e gravità; inoltre, potenziare la resistenza degli animali attraverso una gestione corretta della loro permanenza, soprattutto per quanto riguarda la qualità dell'aria e delle strutture, ne limita la diffusione e, di conseguenza, la gravità delle manifestazioni cliniche.
In sala parto, è utile registrare il numero di primipare/pluripare e l'intervallo di parto, inteso come tempo intercorrente tra il primo e l'ultimo parto, considerando che gli ultimi suinetti nati trovano condizioni ambientali peggiorative e cariche infettanti maggiori rispetto ai primi nati; sono utili le consuete registrazioni, con particolare riguardo a destinazione e numero dei pareggiamenti.
È infine utile conteggiare le lesioni tarsiche allo svezzamento, perché indicano il livello di eliminazione di *S. suis* da parte delle scrofe e sono correlate al rischio di meningite nelle fasi successive. Durante la fase di svezzamento, è necessario monitorare la presenza di casi clinici

e registrarne il numero e l'età di comparsa; ancora più valido, è quantificare i casi nei suinetti provenienti dalle primipare, meglio se mantenuti in gruppi dedicati; infatti, la distribuzione nei gruppi dei suinetti "primipare-derivati" favorisce la propagazione delle batteriosi, in forza del basso livello della protezione passiva e di un'alta prevalenza d'infezioni silenti. È poi utile registrare il numero di trattamenti terapeutici, considerando principio attivo, schema posologico, via di somministrazione ed esito, anche per controllare il mantenimento dell'attività degli antibatterici di più comune impiego. Applicando questo rilievo in modo sistematico, si può utilizzare il risultato per valutare la necessità di un trattamento preventivo nel periparto delle scrofe, per ridurre l'eliminazione di *S. suis* a inizio lattazione, quando il rischio è maggiore.
Purtroppo, ancora oggi, in gran parte degli allevamenti, si ripone un'eccessiva fiducia nella possibilità di controllare la patologia e l'infezione mediante l'impiego terapeutico individuale e strategico degli antibatterici; in realtà nessun trattamento è talmente efficace da impedire l'infezione, mentre l'impiego eccessivo della medicazione di massa sta determinando una graduale perdita di efficacia dei principi tradizionalmente più attivi su *S. suis*.

CONCLUSIONI

La ricerca sulla streptococcosi suina, inizialmente rivolta agli studi epidemiologici, agli schemi terapeutici e alle basi della prevenzione, ha gradualmente privilegiato gli aspetti strutturali del batterio e i riferimenti genomici della sua patogenicità; perciò, oggi sappiamo molto di più sulle caratteristiche biologiche di *Streptococcus suis*, ma abbiamo ancora problemi irrisolti in allevamento.
Pur in assenza d'indicazioni probanti sull'effettiva presenza della malattia nel nostro Paese, è opinione comune che sia diffusa in tutti gli allevamenti, dove viene considerata un problema inevitabile, per il quale l'unica soluzione è stata e in parte è ancora, l'impiego terapeutico degli antibatterici, considerato l'unico metodo possibile per limitare il danno produttivo.
Di fatto, è andata persa la concezione di *Streptococcus suis* come agente infettante opportunista, in grado di sfruttare la presenza di fattori condizionanti, che alterano l'equilibrio organico degli animali; invece, solo individuandoli e verificandoli è possibile leggere l'epidemiologia in ciascun allevamento e quindi definire le strategie d'intervento.
Correlare, attraverso studi longitudinali, lo stato infettivo e immunitario delle scrofe (primipare o pluripare) con la "storia" sanitaria e produttiva dei suini derivati, può rappresentare una metodologia d'intervento preventiva e di controllo allo stesso tempo; in prospettiva e considerate le crescenti limitazioni nell'impiego degli antibatterici, è necessario prestare attenzione alle soluzioni alternative, soprattutto se efficaci e a basso costo.

BIBLIOGRAFIA DI CONSULTAZIONE

1. Chatellier S., Hare l.J., Zhang Y., Gottschalk M., Higgins R., Devriese L.A., Brousseau R. (1998). Phylogenetic diversity of Streptococcus suis strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 581–589.
2. Dechêne-Tempier M., Marois-Créhan C., Libante V., Jouy E., Leblond-Bourget N., Payot S. (2021). Update on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic Pathogen Streptococcus suis. Microorganisms. 9: 1765-1780.
3. Holmer I., Salomonsen C.M., Jorsal S.E., Astrup L.B., Jensen V.F., Høg B.B., Pedersen K. (2019). Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. BMC Vet. Res. 15; 1–13.
4. Hong Thuy Tien L., Nishibori T., Nishitani Y., Nomoto R., Osawa R. (2013). Reappraisal of the taxonomy of Streptococcus suis serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA–DNA homology and sodA and recN phylogenies. Vet. Microbiol. 162: 842-849.

5. Okura M., Osaki M., Nomoto R., Arai S., Osawa R., Sekizaki T., Takamatsu D. (2016). Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. Pathogens. 5: 45-59.
6. Pan Z., Ma J., Dong W., Song W., Wang K., Lu C., Yao H. (2015). Novel variant serotype of Streptococcus suis isolated from piglets with meningitis. Appl. Environ. Microbiol. 81: 976–985.
7. Pan Z., Liu J., Zhang Y., Chen S., Ma J., Dong Z., Wua Z., Yao H. (2019). A novel integrative conjugative element mediates transfer of multi-drug resistance between Streptococcus suis strains of different serotypes. Vet. Microbiol. 229:110-116.
8. Rieckmann K., Pendzialek S.M., Vahlenkamp T., Baums C.G. (2020). A critical review speculating on the protective efficacies of autogenous Streptococcus suis bacterins as used in Europe. Porcine Health Management. https://doi.org/10.1186/s40813-020-00150-6

STREPTOCOCCOSI: L'ESPERIENZA OLANDESE

TIJS T. (DVM, PhD, MSc, Dipl ECPHM)

Royal GD, Deventer, the Netherlands

INTRODUZIONE

Con il termine streptococcosi, viene definita una malattia nei suini causata da *Streptococcus suis* (SSu). SSu è un batterio gram-positivo che può causare malattie nei suini, caratterizzate da segni clinici neurologici, cardiovascolare, respiratori o locomotorii, nonché da sintomi che riflettono una malattia generalizzata. La streptococcosi si osserva principalmente nei suini dopo lo svezzamento, ma possono essere colpiti anche i suinetti lattanti, i magroni e i grassi. I segni clinici nelle scrofette o nelle scrofe vengono descritti raramente.
Sebbene la patogenesi della streptococcosi sia studiata da molto tempo, non è ancora completamente chiarita. Non esiste né un composto antimicrobico totalmente efficace, né una strategia, per eradicare SSu da un allevamento di suini, né esiste un vaccino completamente efficace disponibile per la prevenzione dell'infezione. Il controllo della streptococcosi è stato ed è spesso associato a un elevato uso di antimicrobici, che comprende anche i composti antimicrobici designati come "di importanza critica" secondo il WHO.
Questo articolo riflette il contenuto della conferenza tenutasi alla giornata SIPAS il 13 ottobre 2023 e descrive le più importanti azioni formali e informali effettuate dal 2008 in poi per prevenire e controllare la streptococcosi negli allevamenti olandesi con l'obiettivo finale di ridurre l'uso di antimicrobici.

La strada verso la riduzione degli antibiotici in Olanda

Nel 2005, l'MRSA associato al bestiame (LA-MRSA) è stato segnalato per la prima volta in Olanda in un membro della famiglia di un allevatore di suini (Voss, Loeffen, Bakker, Klaassen, & Wulf, 2005). Poco dopo. A seguito del rilevamento sempre più frequente di LA-MRSA, è diventato anche evidente che, parallelamente al divieto dell'utilizzo di promotori della crescita nel bestiame, le vendite di antibiotici negli animali da reddito in Olanda erano salite ai primi posti in Europa. Nello stesso periodo è stato anche segnalato un aumento della multiresistenza in *E. coli* (commensale) dai programmi di monitoraggio nazionali (de Greeff, Kolwijck, Schoffelen e Verduin, 2022) ed un aumento dei livelli di geni ESBL negli animali da reddito. Queste evidenze hanno portato a uno stimolo scientifico, a un maggiore interesse mediatico e conseguentemente a una maggiore consapevolezza politica e a un movimento per ridurre l'uso di antimicrobici negli allevamenti industriali.

Nel 2008 è stato firmato un patto da tutte le principali parti interessate dell'industria zootecnica, tra cui l'Associazione Veterinaria Reale Olandese (RNVA (= KNMvD in olandese)), per aumentare gli sforzi tesi a ridurre la resistenza agli antibiotici e migliorare la sostenibilità dell'allevamento. Tale patto descriveva le responsabilità degli allevatori e dei veterinari per quanto riguarda la prescrizione e l'uso di antibiotici, l'accordo per registrare l'uso a livello di allevamento e la successiva rendicontazione trasparente, comprese le analisi comparative, e le azioni specifiche per migliorare la qualità della prescrizione e la ricerca necessaria per studiare l'associazione tra l'uso di antibiotici e l'induzione della resistenza.

Intorno al 2010, il governo olandese si è fatto avanti e ha esortato i veterinari e l'industria degli animali da reddito a ridurre l'uso di antibiotici del 20% nel 2011 e del 50% nel 2013

rispetto al 2009. Nel 2011, il governo olandese era persino pronto a proporre una legge per vietare la vendita di antibiotici da parte dei veterinari, nel caso in cui le vendite non fossero dimezzate entro il 2013 (Bleker, 2011). Questa potenziale modifica nella legislazione ha stimolato il cambiamento, che era già stato avviato da iniziative private, concordato nel patto del 2008, per ridurre l'uso di antibiotici negli animali da reddito.

Pilastri della riduzione degli antibiotici

La trasparenza nella prescrizione e nell'utilizzo degli antibiotici è stato uno dei principi fondamentali della strategia di riduzione dell'uso di antibiotici. Per realizzare ciò, nel 2010 è stato istituito un Istituto di medicina veterinaria olandese (SDa) indipendente e i dati di vendita di antibiotici per gli animali da reddito sono stati raccolti per ogni allevamento e trasmessi all'SDa. SDa analizza i dati e riferisce annualmente sull'uso totale e sull'uso per specie (e, se del caso, per categoria di animali) e per classi di antibiotici (The Netherlands Veterinary Medicines Institute, 2023).

L'SDa ha inoltre fissato rapidamente valori di "riferimento" per specie/categoria animale per l'uso di antibiotici considerati all'interno dell'intervallo accettabile e per l'uso che potrebbe essere considerato eccessivo. I valori di riferimento sono stati abbassati alcune volte, tra il 2010 e il 2020, poiché nel corso del tempo i valori nazionali mediani, medi e interquartili sono diminuiti, a sostegno dell'opinione che fosse possibile un utilizzo ancora più basso. I valori di riferimento, pubblicati da SDa e incorporati nei manuali di qualità privati per la produzione di carne suina (ad esempio "IKB", www.ikbvarken.nl) sono oltre la legge e servono a molteplici scopi.

In primo luogo, questi parametri di riferimento aiutano a creare consapevolezza sull'uso degli antibiotici negli allevatori, nonché nei loro veterinari e altri consulenti aziendali. Gli allevatori e i veterinari hanno informazioni in tempo reale sull'uso specifico degli antibiotici dell'allevamento. In secondo luogo, per alcuni allevatori, la conoscenza dell'uso rispetto all'uso medio nazionale si associa ad un certo status sociale. Soprattutto gli allevatori che utilizzano pochi antibiotici possono essere pubblicamente orgogliosi dello stato di salute dei loro allevamenti. Gli allevatori che continuano ad utilizzare alti livelli di antibiotici e che hanno utilizizzato un numero significativamente maggiore di antibiotici anno dopo anno, sono di solito meno sensibili all'opinione pubblica.

Per gli allevamenti con un uso eccessivo di antibiotici, c'è ora un rischio maggiore di essere soggetti a visite di controllo ufficiali in allevamento e a controlli sul loro veterinario. Inoltre, hanno un onere amministrativo più elevato, in quanto gli standard di qualità privati richiedono loro di erigere piani d'azione per migliorare la situazione sanitaria e ridurre l'uso di antibiotici nel tempo. Più di recente, sono entrate in vigore schemi privati che possono persino escluderegli allevamenti con un uso eccessivo di antibiotici dalla loro selezione per il marchio di qualità, che è essenziale per poter macellare suini in Olanda.

Per prevenire il potenziale passaggio degli allevatori ad altri veterinari che forniscono e prescrivono farmaci, è entrato in vigore un collegamento 1 a 1 che consente a un allevatore di ottenere antibiotici da un solo veterinario. Questo legame mira anche a incoraggiare i veterinari a resistere a qualsiasi pressione da parte degli allevatori o dei colleghi per prescrivere in modo coerente in determinati allevamenti.

Riduzione dell'uso di antibiotici per la streptococcosi

Parallelamente alla direttiva governativa per ridurre l'uso di antibiotici, sono state lanciate diverse iniziative per facilitare e consentire una riduzione dell'uso di antibiotici. Sebbene SDa disponga di dati sulla vendita di antibiotici per allevamento, mancano dati sull'indicazione per l'uso per allevamento. Studi qualitativi hanno rivelato, ripetutamente, che la streptococcosi è una delle malattie per le quali gli allevamenti suini applicano più frequentemente una terapia orale discontinua con antibiotici e più frequentemente utilizzano antibiotici di seconda scelta, con una probabilità più alta di superare il valore di riferimento SDa.

L'RNVA ha sviluppato, insieme al mondo accademico, agli istituti di ricerca e ai veterinari, diverse "linee guida veterinarie" che descrivono procedure all'avanguardia, accettate dai professionisti del settore, per prescrivere antibiotici in ambito clinico per diverse specie animali e indicazioni.

I veterinari olandesi avevano già esperienza nell'uso dei prontuari fin dagli anni Novanta. I prontuari indirizzano la scelta di un determinato composto antibiotico per uno specifico agente patogeno in una specifica specie animale, sulla base dello spettro del composto attivo, degli antibiotici autorizzati disponibili, dei modelli di sensibilità dei patogeni disponibili, dei criteri di importanza dell'OMS per l'uso nell'uomo e delle conoscenze degli esperti. In quanto tali, i prontuari sono uno strumento per la prescrizione selettiva di antibiotici negli animali (Werkgroep Veterinair Antibioticum Beleid, 2023), ma non hanno mai considerato la riduzione dell'uso degli antibiotici. Inoltre, i prontuari non tengono conto di tutte le fasi del processo diagnostico e delle considerazioni per la prescrizione di un antibiotico.

Per colmare le lacune presenti, al fine di un ridotto e prudente uso degli antibiotici, è stata pubblicata una linea guida generale sulla prescrizione di antibiotici (Richtlijncommissie, 2015), accanto a una linea guida specifica per il trattamento e la prevenzione della streptococcosi nei suini svezzati (Richtlijncommissie, 2014). La linea guida per la streptococcosi nei suini, ad esempio, descrive le considerazioni e le fasi diagnostiche per giustificare una terapia antibiotica sul lotto di animali.

Oltre alla linea guida sulla streptococcosi in Olanda, sono stati condotti diversi progetti di ricerca e di campo sull'epidemiologia, la patogenesi, la diagnosi di SSu e, in generale, sui fattori di rischio e di successo per un basso uso di antibiotici. Durante la giornata SIPAS è stata fornita una breve panoramica di alcuni risultati principali, che sono brevemente riassunti di seguito. Per i dettagli specifici, si raccomanda al lettore di consultare la bibliografia citata.

<u>Transmissione</u>
Per prevenire la malattia, l'obiettivo finale è impedire che i suini si infettino e successivamente si colonizzino, interrompendo la trasmissione. La conoscenza della propagazione e della trasmissione del batterio può aiutare a progettare gli interventi preventivi.

È noto che i suini possono essere portatori subclinici di SSu nel tratto respiratorio superiore/orale e che il ruolo di portatore subclinico può essere indagato mediante campionamento delle tonsille (Swildens et al., 2005) o della saliva (Dekker et al., 2017) e successivo test PCR (Willemse et al., 2019). In un contesto di ricerca con suinetti nati per parto cesareo e privati del colostro, Dekker ha dimostrato che SSu si trasmette rapidamente tra i suini

dello stesso box e in modo circa 36 volte meno efficiente ai suini di un altro box (2013). Un suino portatore subclinico può infettare direttamente 3,58 (95% CI: 2,29-5,60) suini al giorno, mentre infetta indirettamente 0,001 (95% CI: 0,0006-0,0017) suini per ogni giorno cumulativo in cui è infettante. Lo studio ha dimostrato che la separazione spaziale dei gruppi è efficace per rallentare la trasmissione in un compartimento, ma alla fine 13 dei 15 suini alloggiati separatamente si sono infettati per trasmissione indiretta nell'arco di 24 giorni (Dekker et al., 2013). Si è concluso che con una buona biosicurezza e una gestione dei flussi si può prevenire la trasmissione della SSu da compartimento a compartimento, ma si può solo rallentare la trasmissione all'interno dei compartimenti, mentre la trasmissione all'interno dei box è inevitabile. Si può ipotizzare che, nel caso in cui la trasmissione venga bloccata fino al termine di uno specifico periodo di rischio, la malattia possa essere prevenuta.

Prevenzione delle malattie negli allevamenti

Il motivo per cui i suini si ammalano dopo essere stati colonizzati con SSu è in gran parte da chiarire.

Sia l'ospite che i fattori ambientali e batterici sono stati ampiamente studiati, è generalmente accettato che i suini con una buona immunità materna, un'immunità innata ottimale e un'adeguata immunità adattativa, siano meglio equipaggiati per resistere all'infezione. Molte ricerche condotte si stanno traducendo in conoscenze pratiche negli allevamenti per ottimizzare l'acquisizione dell'immunità materna, soprattutto nelle scrofe iperprolifiche moderne.

La streptococcosi si osserva più frequentemente nei suini dopo lo svezzamento, il che ha senso se si considerano le sollecitazioni sull'immunità innata dei suinetti, il declino dell'immunità materna e la perdita dell'immunità lattogenica in questo periodo. Il suino svezzato è soggetto a una cascata di potenziali rischi e potenziali fattori di stress cumulativi. Di natura neofobica, i suinetti possono essere temporaneamente anoressici dopo lo svezzamento. I periodi di anoressia possono essere compensati dalla sovralimentazione e da un cambiamento microbico nell'intestino, in accordo con il rischio di sviluppare diarrea post-svezzamento. Oltre al cambio di alimentazione, il cambiamento di ambiente con potenziali fattori di stress termico, i fattori di stress sociale dovuti al raggruppamento e lo stress fisico dovuto alle ferite si accompagnano alla perdita dell'immunità lattogenica, sottolineando l'estrema stressabilità di questo periodo. In caso di stress elevato e cronico, il sistema immunitario può essere influenzato negativamente. Sebbene la maggior parte dei potenziali fattori di stress nella patogenesi della streptococcosi sia stata studiata in modo indipendente, il quadro completo è molto difficile da osservare e studiare sul campo. Tuttavia, gli allevatori che riescono a ridurre gli antibiotici e a prevenire la streptococcosi, spesso riescono a gestire, almeno in una certa misura, tutte le fasi della cascata di rischi per la streptococcosi.

A sostegno dell'obiettivo di riduzione degli antibiotici, sono stati pubblicati diversi studi sui fattori di rischio per l'uso di antibiotici. Oltre alle dimensioni dell'azienda e alla categoria degli animali, sono spesso riportati i dati relativi alla gestione dell'azienda e alla biosicurezza interna (ad esempio, Mallioris et al., 2022). Inoltre, secondo la nostra esperienza, un'età minima assoluta di svezzamento di 28 giorni o più, contribuisce a ridurre i rischi di maggiore uso di antibiotici.

Anche i componenti dei mangimi e la gestione dell'alimentazione nel periodo pre e post-svezzamento sono stati oggetto di grande attenzione da parte dei veterinari, dell'industria

mangimistica e degli allevatori, al fine di prevenire le malattie e quindi la necessità di ricorrere agli antibiotici.

Inoltre, la progettazione dei box e degli ambienti si è rivelata importante per consentire tutti i comportamenti dei suini, come dormire, mangiare, giocare, defecare, ecc. e prevenire lo stress. Ovviamente, livelli di desità superiori ai livelli minimi previsti dalla legge sono una garanzia di malattia, inoltre è emerso che abbassare la densità di allevamento oltre 0,35m^2 per suino aumenta la possibilità di ottenere prestazioni migliori. Infine, gli allevatori di successo di solito hanno stalle più pulite e utilizzano attrezzature e strumenti puliti. Gli allevatori che riescono a gestire questa cascata hanno maggiori probabilità di tenersi lontani dalla terapia di massa, soprattutto per la streptococcosi.
È inoltre generalmente accettata, sia dagli allevatori che dai veterinari e dal campo della ricerca, l'importanza della prevenzione di infezioni immunosoppressive, come quelle da PRRSV e PCV2 (Thanawongnuwech et al, 2000; Wang, Zhou, Fan, & Wang, 2020), ma anche con virus potenzialmente sinergici come il virus dell'influenza (Wu, Meng, Seitz, Valentin-Weigand, & Herrler, 2015), come rivisto anche da Obradovic, Segura, Segalés e Gottschalk (2021).

In condizioni specifiche, la legislazione europea consente l'uso di patogeni inattivati ottenuti dallo stesso cluster epidemiologico di allevamento, per prevenire le malattie (Parlamento europeo e Consiglio europeo, 2019). Sebbene dal punto di vista scientifico l'efficacia dei vaccini autogeni per SSu sia molto discussa (es. Rieckmann, Pendzialek, Vahlenkamp, & Baums, 2020), si osserva un aumento del loro utilizzo. Si possono considerare diverse ragioni, tra cui una combinazione di fattori sociologici ed economici. Poiché la prevenzione e il controllo della streptococcosi negli allevamenti sono multifattoriali, spesso è interessante tentare un approccio nuovo ed esterno, piuttosto che modificare radicalmente la progettazione o la gestione dell'allevamento. Inoltre, l'uso del vaccino autogeno nelle scrofe, per proteggere i suinetti, è una misura relativamente a basso costo rispetto alla modifica della progettazione o della gestione dell'allevamento. Infine, poiché tutti i laboratori hanno le proprie procedure per la produzione di vaccini autogeni, non è escluso che in alcuni allevamenti l'uso di tali vaccini possa migliorare la situazione per SSu, magari anche solo per un periodo di tempo limitato.

Diagnostica
Oltre all'identificazione della specie batterica e ai test di sensibilità agli antibiotici, in situazioni specifiche può essere utile ottenere informazioni sul sierotipo e sulla presenza di geni di virulenza specifici di SSu mediante PCR, ad esempio suilysina, proteina extracellulare (EF), proteina rilasciata dalla muramidasi (MRP). Sebbene, purtroppo, la presenza di geni di virulenza non sia sempre correlata alla malattia (Willemse et al., 2019), i risultati di questi test possono rivelare se il ceppo causale dell'azienda è cambiato o è stato sostituito da un altro.

Il confronto genetico di ceppi isolati nella stessa azienda nel tempo o da casi epidemiologicamente collegati è ancora piuttosto costoso se si utilizza il sequenziamento dell'intero genoma. Un'alternativa promettente per questo scopo sembra essere una tecnica di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR), commercializzata come IR Biotyper (Hu et al., 2023). In Olanda, la Royal GD ha recentemente introdotto questa tecnica per SSu e nella fase di validazione è sembrato possibile distinguere ceppi di sierotipi diversi, così come ceppi dello stesso sierotipo e persino ceppi dello stesso sequence type. Attualmente, la tecnica viene promossa negli allevamenti in cui la streptococcosi è riemersa per motivi sconosciuti,

nonché nei casi in cui l'efficacia del vaccino è messa in discussione, per confrontare i ceppi trovati più di recente con quelli isolati in precedenza. In questo momento la tecnica ha già evidenziato che la diversità dei ceppi trovati negli allevamenti può essere molto più alta di quanto si fosse stimato in precedenza unicamente sulla base della combinazione di sierotipo e esiti della PCR per i fattori di virulenza.

Cambiamento di atteggiamento/comportamento di allevatori e veterinari

Oltre ai numerosi sforzi tecnici, gestionali, di biosicurezza e di salute animale per prevenire la streptococcosi e ridurre l'uso di antibiotici, sono stati compiuti ampi sforzi per sfruttare le scienze sociali e i modelli di cambiamento del comportamento per modificare il modo in cui gli antibiotici vengono prescritti e utilizzati.

Esempi di questo sono la teoria del comportamento pianificato (Speksnijder & Wagenaar, 2018) e l'uso di modelli come RESET® (Lam, Jansen, & Wessels, 2017) e ADKAR® (Houben, 2020). Molti di questi modelli sono accomunati dal fatto che un cambiamento nel comportamento degli individui di una popolazione può essere solo il risultato di azioni complementari. Tutti gli individui variano nella percezione dei bisogni di cambiamento del comportamento (Consapevolezza), nelle motivazioni (Desiderio), nelle conoscenze su come cambiare e nei mezzi (Capacità), come tempo, energia e risorse per conformarsi al cambiamento di comportamento. Infine, il cambiamento di comportamento dovrebbe essere gratificante, sia in termini monetari che di status sociale, ecc.

Per i veterinari può essere particolarmente utile sapere in quale "fase" si trova un allevatore quando affronta la modifica dell'uso degli antibiotici o la prevenzione della streptococcosi. Una delle insidie dei consulenti aziendali, tra cui il veterinario, è quella di concentrarsi solo su questioni tecniche veterinarie. Ad esempio, se un allevatore non è nemmeno consapevole dei rischi di resistenza agli antibiotici, non ha senso fornire un sovraccarico di informazioni sulla biosicurezza, per ridurre l'uso di antibiotici. In questo caso, bisogna concentrarsi prima sulla sensibilizzazione e sulla creazione del desiderio di cambiare, altrimenti il processo diventa frustrante per entrambi.

CONCLUSIONI

Questo manoscritto riassume brevemente gli eventi, i processi e le azioni che si sono verificati nell'industria suinicola olandese, in relazione all'uso degli antibiotici e in particolare alla prevenzione della streptococcosi.

Come si è concluso durante la conferenza, dobbiamo imparare a convivere con SSu, in quanto è intrinsecamente legato ai suini, ma dobbiamo anche imparare a prevenire e controllare la streptococcosi in modo prudente.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr. Jobke van Hout-van Dijk of Royal GD per la lettura critica del manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

1. Bleker, H. S., I. (2011). *Brief van de Staatssecreataris van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie en de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport*. 's Gravenhave: Tweede Kamer der Staten-Generaal Retrieved from https://www.tweedekamer.nl/kamerstukken/brieven_regering/detail?did=2011D58264&id=2011Z24290.
2. de Greeff, S., Kolwijck, E., Schoffelen, A., & Verduin, C. (2022). NethMap 2022. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2021 / MARAN 2022. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2021. In *NethMap 2022. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial*

resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2021 / MARAN 2022. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2021 (pp. 286): Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.

3. Dekker, N., Bouma, A., Daemen, I., Klinkenberg, D., van Leengoed, L., Wagenaar, J. A., & Stegeman, A. (2013). Effect of spatial separation of pigs on spread of Streptococcus suis serotype 9. *PLoS One, 8*(4), e61339. doi:10.1371/journal.pone.0061339
4. Dekker, N., Bouma, A., Daemen, I., Vernooij, H., van Leengoed, L., Wagenaar, J. A., & Stegeman, A. (2017). Effect of Simultaneous Exposure of Pigs to Streptococcus suis Serotypes 2 and 9 on Their Colonization and Transmission, and on Mortality. *Pathogens, 6*(4). doi:10.3390/pathogens6040046
5. 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, (2019).
6. Houben, M. A. M. C., N.; van den Hoogen, A.; Ringenier, M.; Tobias, T. J.; Jonquiere, F. J.; Sleeckx, N.; Velkers, F. C.; Stegeman, J. A.; Dewulf, J.; Postma, M. (2020). Het ADKAR®-verandermodel voor typering van veehouders met betrekking tot verantwoord antibioticagebruik bij landbouwhuisdieren. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 89*(6).
7. Hu, Y., Zhu, K., Jin, D., Shen, W., Liu, C., Zhou, H., & Zhang, R. (2023). Evaluation of IR Biotyper for carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa typing and its application potential for the investigation of nosocomial infection. *Front Microbiol, 14*, 1068872. doi:10.3389/fmicb.2023.1068872
8. Lam, T., Jansen, J., & Wessels, R. J. (2017). The RESET Mindset Model applied on decreasing antibiotic usage in dairy cattle in the Netherlands. *Ir Vet J, 70*, 5. doi:10.1186/s13620-017-0085-x
9. Mallioris, P., Dohmen, W., Luiken, R. E. C., Wagenaar, J. A., Stegeman, A., & Mughini-Gras, L. (2022). Factors associated with antimicrobial use in pig and veal calf farms in the Netherlands: A multi-method longitudinal data analysis. *Prev Vet Med, 199*, 105563. doi:10.1016/j.prevetmed.2021.105563
10. Obradovic, M. R., Segura, M., Segalés, J., & Gottschalk, M. (2021). Review of the speculative role of co-infections in Streptococcus suis-associated diseases in pigs. *Vet Res, 52*(1), 49. doi:10.1186/s13567-021-00918-w
11. Richtlijncommissie. (2014, 26-03-2014). Richtlijn Streptococcus suis bij gespeende biggen. Retrieved from https://www.knmvd.nl/app/uploads/2022/03/RICHTLIJN-STREPTOCOCCUS-SUIS-DEF-APRIL-2014.pdf
12. Richtlijncommissie. (2015, 24-03-2015). Richtlijn Toepassen van antimicrobiële middelen. Retrieved from https://www.knmvd.nl/app/uploads/2022/03/150513-Richtlijn-TAM-definitief-versie-1.1.pdf
13. Rieckmann, K., Pendzialek, S. M., Vahlenkamp, T., & Baums, C. G. (2020). A critical review speculating on the protective efficacies of autogenous Streptococcus suis bacterins as used in Europe. *Porcine Health Manag, 6*, 12. doi:10.1186/s40813-020-00150-6
14. Speksnijder, D. C., & Wagenaar, J. A. (2018). Reducing antimicrobial use in farm animals: how to support behavioral change of veterinarians and farmers. *Anim Front, 8*(2), 4-9. doi:10.1093/af/vfy006
15. Swildens, B., Wisselink, H. J., Engel, B., Smith, H. E., Nielen, M., Verheijden, J. H. M., & Stegeman, J. A. (2005). Detection of extracellular factor-positive Streptococcus suis serotype 2 strains in tonsillar swabs of live sows by PCR. *Veterinary Microbiology, 109*(3), 223-228. doi:10.1016/j.vetmic.2005.04.024
16. Thanawongnuwech, R., Brown, G. B., Halbur, P. G., Roth, J. A., Royer, R. L., & Thacker, B. J. (2000). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to Streptococcus suis infection. *Vet Pathol, 37*(2), 143-152. doi:10.1354/vp.37-2-143

17. The Netherlands Veterinary Medicines Institute. (2023). *Usage of Antibiotics in Agricultural Livestock in the Netherlands in 2022*. Retrieved from Utrecht, the Netherlands: https://cdn.i-pulse.nl/autoriteitdiergeneesmiddelen/userfiles/EN/SDa-rapporten/engels-def-sda-rapport-met-brief---het-gebruik-van-antibiotica-bij-landbouwhuisdieren-in-2022-revision.pdf
18. Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., & Wulf, M. (2005). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming. *Emerg Infect Dis, 11*(12), 1965-1966. doi:10.3201/eid1112.050428
19. Wang, Q., Zhou, H., Fan, H., & Wang, X. (2020). Coinfection with Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) and Streptococcus suis Serotype 2 (SS2) Enhances the Survival of SS2 in Swine Tracheal Epithelial Cells by Decreasing Reactive Oxygen Species Production. *Infect Immun, 88*(11). doi:10.1128/iai.00537-20
20. Werkgroep Veterinair Antibioticum Beleid. (2023, 2023). Formularies for veterinary use. Retrieved from https://www.wvab.nl/formularia/
21. Willemse, N., van der Ark, K. C. H., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H., Picavet, D. I., van Solt-Smits, C., . . . de Greeff, A. (2019). Clonal expansion of a virulent Streptococcus suis serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. *Sci Rep, 9*(1), 15429. doi:10.1038/s41598-019-51576-0
22. Wu, N. H., Meng, F., Seitz, M., Valentin-Weigand, P., & Herrler, G. (2015). Sialic acid-dependent interactions between influenza viruses and Streptococcus suis affect the infection of porcine tracheal cells. *J Gen Virol, 96*(9), 2557-2568. doi:10.1099/jgv.0.000223

POSSIBILI STRATEGIE NUTRIZIONALI PER CONTROLLARE LE INFEZIONI DA STREPTOCOCCO NEI SUINETTI SVEZZATI

JAN DIRK VAN DER KLIS, PhD

Arctium lappa consultancy, Amersfoort, The Netherlands
jdvdklis@gmail.com

INTRODUZIONE

Streptococcus suis (S. suis) è un importante patogeno zoonotico presente negli allevamenti suini su scala globale. Colonizza le tonsille e le prime vie respiratorie, dove è normalmente presente. L'intestino e le vie genitali possono essere ulteriori siti di colonizzazione. Poiché *S. suis* si trova nella vagina della scrofa, i suinetti possono infettarsi già alla nascita (Sagura et al., 2020). Sono noti almeno 29 diversi sierotipi, che differiscono per virulenza. Tra questi, il sierotipo 2 è predominante negli isolati di suini malati e nell'uomo (Lun et al., 2007). La trasmissione all'uomo può essere dovuta al contatto ravvicinato con suini malati o portatori, o al consumo di carne di maiale poco cotta. *S. suis* è una delle principali cause di morte dei suinetti dalle 5 alle 10 settimane di età. I segni clinici di un'infezione da *S. suis* sono polmonite, meningite, artrite, endocardite e setticemia (Gottschalk e Segura, 2019).
Nonostante un alto tasso di suini portatori, l'incidenza delle malattie associate a *S. suis* è solitamente inferiore al 5%.
Recentemente, Obradovic et al. (2021) hanno esaminato il ruolo delle **co-infezioni** con patogeni virali e batterici nelle malattie associate a *S. suis* nei suini, poiché la presenza di ceppi di *S. suis* potenzialmente virulenti da soli nel tratto respiratorio superiore non era correlata direttamente alla presenza di segni clinici.
L'interazione tra la salute respiratoria e intestinale è un fattore importante per capire perché i ceppi commensali di *S. suis* possono diventare patogeni (Yang et al., 2022a).
In questo articolo viene discussa l'importanza dell'**asse intestino-polmone** nelle malattie correlate a *S. suis,* così come il ruolo delle potenziali co-infezioni. Capire come *S. suis* passi dalla colonizzazione alla malattia è essenziale per progettare strategie nutrizionali efficaci per controllare le infezioni da *S. suis*, considerando che la vaccinazione non si è finora dimostrata una strategia di prevenzione efficace.
Lo stress e l'immunità sono fattori importanti coinvolti nel processo di virulenza, in cui lo **svezzamento**, lo stress ambientale e sociale e le co-infezioni con altri agenti patogeni (batteri e virus) hanno dimostrato di svolgere un ruolo significativo.

L'asse intestino-polmone

La salute respiratoria e intestinale sono erroneamente considerate separatamente quando si studiano le strategie nutrizionali per controllare gli effetti delle infezioni batteriche e/o virali. Yang et al. (2022a) hanno riassunto alcuni recenti esperimenti che dimostrano che "la disbiosi del microbiota intestinale può aggravare l'estensione delle infezioni polmonari", suggerendo così che il microbiota intestinale potrebbe svolgere un ruolo nella patogenicità di *S. suis*.
La loro ricerca è stata condotta per studiare l'interazione tra il microbiota intestinale e la gravità di un'infezione polmonare causata da *S. suis*, sierotipo 2 (SS2) in topi SPF. Lo studio prevedeva quattro gruppi:

1. Controllo
2. Infezione con *S. suis*, sierotipo 2 (SS2) mediante nasal drip
3. Disbiosi indotta del microbiota intestinale attraverso l'apporto di antibiotici ad ampio spettro attraverso l'acqua
4. Infezione da SS2 dopo disbiosi indotta del microbiota

Rispetto al controllo, l'infezione con solo SS2 (T2) ha provocato 1) una perdita di epitelio alveolare, ispessimento della parete alveolare e edema polmonare; 2) un aumento significativo delle citochine pro-infiammatorie (es. IL-2, IL-12 e TNF-alpha) e una diminuzione delle citochine antinfiammatorie (es. IL-4) nei polmoni, favorendo l'infiammazione polmonare; 3) un aumento delle citochine pro-infiammatorie nel digiuno e nell'ileo e una tendenza alla diminuzione delle citochine antinfiammatorie nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo, correlata ad un mutato equilibrio tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa e una tendenza alla diminuzione delle citochine antinfiammatorie nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo; 4) una risposta immunitaria cellulo- mediata da Th1 e una risposta immunitaria umorale soppressa mediata dalle cellule Th2-, con conseguente disbiosi del microbioma intestinale.
Quando gli animali sono stati infettati con SS2 dopo la disbiosi indotta del microbioma intestinale, la barriera della mucosa intestinale è stata danneggiata più gravemente e il grado di infiltrazione delle cellule infiammatorie negli alveoli polmonari è risultato aggravato rispetto alla sola infezione da SS2.
Yang et al. (2022a) hanno concluso che la "comunicazione" tra il microbioma intestinale e l'infezione polmonare causata da SS2 avveniva principalmente attraverso queste vie immunitarie. Gli autori non hanno osservato la diffusione di *S. suis* ad altri organi nel loro modello murino, mentre altri hanno dimostrato che *S. suis* può penetrare le barriere mucosali dell'ospite ed entrare nel flusso sanguigno nei suinetti (come esaminato da Sagura et al., 2020).

Co-infezione con altri agenti patogeni

Diversi studi hanno dimostrato un'associazione tra il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV) e *S. suis* riguardo la gravità della malattia nei suini. Obradovic et al. (2021) hanno osservato un aumento dell'isolamento del sierotipo 2 di *S. suis* nel sangue e nei tessuti interni dei suini provenienti da allevamenti affetti da PRRSV. Vari studi concordano che un'infezione intranasale da PRRSV nei suinetti svezzati, seguita 5-7 giorni dopo dall'infezione da *S. suis* esita in mortalità e morbilità elevate in confronto a suinetti infettati solo da S.suis. Ciò potrebbe essere correlato agli effetti immunosoppressivi e infiammatori del PRRSV, con conseguente alterazione dell'equilibrio Th1/Th2, legato a una risposta aggravata a un'infezione da S. suis come indicato da Yang et al. (2022a).
Segura et al. (2020) hanno riferito che in 3.330 casi in cui il virus dell'influenza suina (SIV) è stato identificato come agente eziologico primario di casi di malattia respiratoria suina, il 75% ha avuto anche polmonite batterica secondaria, con *S. suis, P. multocida, G. parasuis, B. bronchiseptica* ed *E. coli* come batteri maggiormente isolati. Quadro simile a quando PRRSV era l'agente eziologico primario.
Uno studio di co-infezione con *B. bronchiseptica* in suinetti neonati SPF ha mostrato che *S. suis* ha colonizzato i polmoni solo quando i suinetti erano predisposti dall'infezione con *B. bronchiseptica*, indicando che *S. suis* agiva da agente patogeno secondario (Vecht et al. (1992), vedi Obradovic et al. (2021).
Questi studi dimostrano che l'eziologia della malattia respiratoria suina è complessa, in cui non è sempre chiaro il ruolo di *S. suis* come patogeno primario o secondario.

Effetto dello svezzamento

Sebbene i fattori di rischio delle infezioni da *S. suis* nei suinetti siano solo parzialmente compresi, lo stress da fattori nutrizionali e ambientali durante il (precoce) periodo post-svezzamento mette a dura prova l'immunocompetenza e provoca disbiosi del microbiota intestinale, con conseguente risposta infiammatoria, compromissione della funzione di barriera intestinale, ridotta digeribilità dei nutrienti e diarrea post-svezzamento (Tang et al., 2022).

Pié et al. (2004) hanno mostrato un aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie nel segmento dell'intestino medio-tenue durante i primi 2 giorni post-svezzamento (i suinetti sono stati svezzati a 28 giorni di età), mentre Limbach et al. (2021) hanno mostrato livelli più alti di citochine pro-infiammatorie nel siero a 6-13 giorni dopo lo svezzamento. Nel loro studio, i suinetti sono stati svezzati a 20 giorni di età. Gli effetti dello svezzamento risultano generalmente aggravati quando i suinetti vengono svezzati in età precoce, dove la sovrapproduzione di citochine pro-infiammatorie porta a danni e disfunzioni intestinali come esaminato da Tang et al. (2022).
Neila-Ibáňez et al. (2023) hanno condotto uno studio longitudinale su due allevamenti di suini in Spagna, confrontando un allevamento con malattia associata a *S. suis* (dal 5,5% al 18% nella fase iniziale dello svezzamento), con un altro allevamento negativo (meno dello 0,3%). I risultati indicano la co-infezione da PRRSV a 5 settimane di età come fattore di rischio, essendo correlata a segni clinici coerenti con infezione da *S. suis* a 7 settimane di età. Gli autori non hanno dimostrato l'effetto di altri virus come il virus influenzale, a causa di una bassa prevalenza negli allevamenti nel loro studio.
In altri studi, un'elevata umidità relativa nelle sale parto o una maggiore CO_2 in svezzamento hanno favorito la prevalenza della malattia associata a *S. suis*, indicando l'importanza di una corretta ventilazione. Infine, i suinetti affetti hanno mostrato un livello più elevato di diversi biomarcatori nel sangue come cortisolo, H_2O_2 e aptoglobina (che indicano stress e risposta infiammatoria) rispetto ai suinetti sani.

Possibili strategie nutrizionali per controllare le infezioni da S. suis nei suinetti

Dalle sezioni precedenti si conclude che le potenziali strategie nutrizionali per limitare le infezioni da *S. suis* nei suinetti svezzati dovrebbero:

- controllare la salute intestinale limitando la disbiosi del microbiota
- avere effetti antimicrobici e/o antivirali diretti a livello respiratorio e intestinale
- migliorare l'immunocompetenza e/o controllare la risposta infiammatoria.

A causa delle strette interazioni tra salute intestinale e respiratoria, gli interventi nutrizionali per ridurre la diarrea post-svezzamento nei suinetti molto probabilmente aiuteranno a mitigare anche le malattie correlate a *S. suis* in svezzamento.
Poiché sono state pubblicate molte ricerche incentrate sugli effetti degli ingredienti dei mangimi e sui loro livelli (livello e fonte di proteine, composizione di fibre e grassi (in) solubili), sulla forma del mangime (liquido/secco, grossolano/fine e pellettato/sbriciolato/farina) e su un'ampia gamma di additivi per mangimi sulla diarrea post-svezzamento (Canibe et al., 2021; Huting et al., 2021; Zheng et al., 2021), questi argomenti verranno tralasciati in questo articolo. Tuttavia, poiché la restrizione proteica viene spesso utilizzata nei suinetti in fase di svezzamento come strategia efficace per alleviare la disfunzione intestinale, vengono qui riportati alcuni dati. Inoltre, vengono trattati i monogliceridi degli acidi grassi a catena media (MCFA), in quanto mostrano efficacia in tutte e tre le categorie menzionate. Infine, verrà presentato come "spunto di riflessione" uno studio che ha dimostrato l'efficacia del *Solanum glaucophyllum*, come fonte vegetale di 1,25 diidrossicolecalciferolo, contro la condronecrosi batterica con osteomielite (BCO) nei polli da carne.

Restrizione proteica alimentare nei suinetti in fase di svezzamento e salute dell'intestino
Una riduzione dei livelli di proteine alimentari in combinazione con l'uso limitato di fonti

proteiche vegetali contenenti alti livelli di fattori antinutrizionali, è ormai una strategia comune per alleviare i problemi di salute intestinale nei suinetti in fase di svezzamento. Kil e Stein (2010) hanno raccomandato che "la concentrazione di proteine grezze nelle diete somministrate ai suini durante le prime 2-4 settimane dopo lo svezzamento deve essere intorno o inferiore al 18%".
Hou et al. (2021) hanno testato l'effetto della restrizione proteica dal 20,1 al 16,3% di CP durante le prime due settimane dopo lo svezzamento, seguita da una fase di ri-alimentazione utilizzando una dieta con il 19,4% di CP. La dieta di svezzamento è stata utilizzata fino a un peso corporeo target di 25 kg. Le diete per lo svezzamento contenevano siero di latte in polvere, concentrato di proteine del siero di latte e farina di pesce come fonti proteiche non vegetali ed erano standardizzate per il contenuto di aminoacidi (su base SID) per soddisfare le raccomandazioni NRC. Le prestazioni di crescita dei suinetti sono mostrate in tabella 1.

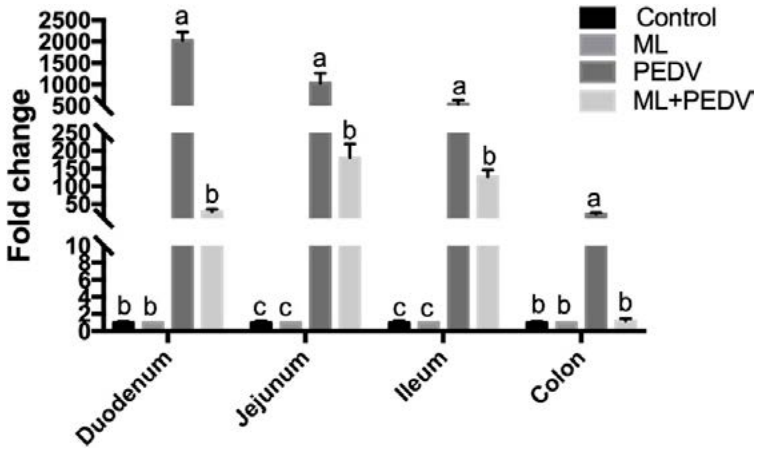
Tabella 1. Effetto della restrizione proteica durante la fase di svezzamento sulle performance produttive dei suinetti (Hou et al., 2021)

	20.1 % CP	**16.3 % CP**	**P-value**
Fase di svezzamento (g 0-14)			
ADG, g	324	261	0.041
ADFI, g	418	372	0.093
FCR	1.29	1.42	0.022
Incidenza di diarrea	2.00	0.29	0.060
Dal g 0 a 25 kg di PV			
ADG, g	455	452	0.814
ADFI, g	708	718	0.413
FCR	1.56	1.59	0.283
Incidenza di diarrea	3.76	1.56	0.095
Giorni di sperimentazione	40.8	41.5	0.537

Sebbene la restrizione proteica abbia comportato una riduzione del peso dei suinetti a 14 giorni dallo svezzamento (10,9 kg vs 10,0 kg; P= 0,043), la crescita compensatoria durante la fase successiva ha portato a prestazioni simili a 25Kg, riducendo chiaramente l'incidenza della diarrea. Inoltre, Hou et al. (2021) hanno dimostrato che la restrizione proteica nella fase di svezzamento ha contribuito alla salute intestinale alterando il microbiota intestinale e i suoi metaboliti.

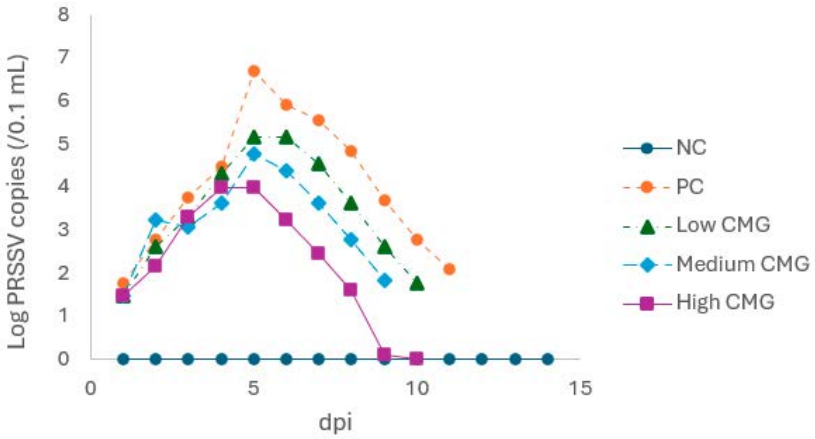
Monogliceridi degli acidi grassi a catena media
La monolaurina (glicerolo monolaurina, GML) è acido laurico monoesterificato, preferibilmente in posizione 1, noto anche come alfa-monolaurina. Barker et al. (2019) hanno mostrato gli effetti antibatterici di GML in vitro contro un'ampia gamma di batteri gram-positivi e gram-negativi patogeni, inclusi diversi batteri coinvolti nelle infezioni da *S. suis*, come *S. suis*, altri Streptococcus spp, *B. bronchiseptica e P. multocida*. Inoltre, Neath et al. (2022) hanno riportato un'elevata efficacia antibatterica di GML contro *S. suis*. Pertanto, GML è un integratore alimentare potenzialmente utile per ridurre l'impatto di *S. suis* come patogeno primario o secondario. Inoltre, sono stati segnalati effetti antivirali contro i virus con involucro lipidico a doppio strato, dove la supplementazione orale con GML (100 mg/kg di peso corporeo) tramite sostituto liquido del latte durante 7 giorni prima di infettare i suinetti con PEDV, ha ridotto la carica virale in tutti i segmenti intestinali (Figura 1) e ha diminuito la diarrea causata dall'infezione (Zhang *et al.*, 2022).

Figura 1. Effetti della somministrazione di GML (100 mg/kg di peso corporeo) per 7 giorni sui livelli di carica virale relativa nei suinetti infetti da PEDV (Zhang et al., 2022). Le barre che non condividono una lettera minuscola comune differiscono in modo significativo (P< 0,05).



Altri (Elrod et al., risultati non pubblicati) hanno dimostrato che i monogliceridi dell'acido caprilico, caprico e laurico hanno forti effetti virucidi contro PEDV e PRRSV in vitro. Yang et al. (2022b) hanno mostrato un'attività anti-PRRSV dose-dipendente del monogliceride dell'acido caprilico (CMG) nei suinetti (Figura 2). Tuttavia, poiché Yang et al. (2022b) hanno indicato che il CMG è diventato efficace solo dopo il quinto giorno, si potrebbe suggerire che una somministrazione anticipata avrebbe avuto effetti preventivi, come mostrato per GML e l' infezione da PEDV (Zhang *et al.*, 2022).

Figura 2. Rilevamento della carica virale in tamponi nasali di suinetti infettati da PRRSV. Studio dose-risposta con 0, 0,5, 1,0 e 2,0 g CMG/kg di peso corporeo, somministrati ai suinetti una volta al giorno per tre giorni, a partire da 24 ore dopo l'infezione da PRRSV (Yang et al., 2022b). Le osservazioni sono state effettuate giornalmente per 14 giorni dopo l'infezione (dpi).



Oltre a questi effetti contro i patogeni coinvolti nella malattia associata a *S. suis*, i monogliceridi MCFA mostrano anche effetti immunomodulatori, riducendo i livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-1beta, IL-6, IL-8 e TNF-alpha) e stimolando il livello della citochina antinfiammatoria IL-10 nel sangue dopo infezioni virali (e.g. Yang et al., 2022b). Si può quindi ipotizzare che questo effetto ripristini l'equilibrio tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa, e quindi riduca la gravità della malattia correlata a *S. suis* a seguito di disbiosi intestinale post-svezzamento.

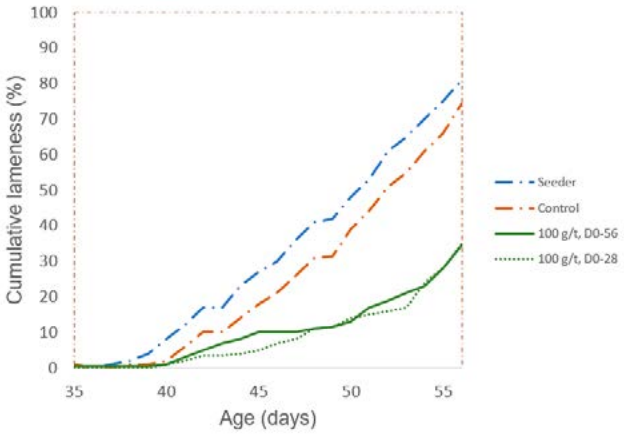
Solanum glaucophyllum come fonte di 1,25 diidrossicolecalciferolo

Il *Solanum glaucophyllum* è una fonte vegetale della forma metabolicamente attiva di vitamina D (1,25 diidrossicolecalciferolo), presente sotto forma di glicosidi. Poiché l'1,25 diidrossicolecalciferolo stimola la produzione di diversi peptidi antibatterici nel sangue, mentre ha anche effetti antinfiammatori, l'effetto del *Solanum glaucophyllum* è stato recentemente testato in un modello BCO nei polli da carne durante un periodo di crescita di 56 giorni. Il modello è descritto da Wideman (2016).

La crescita di polli da carne su pavimenti in filo metallico fornisce un eccellente modello sperimentale per innescare in modo riproducibile livelli significativi di zoppia attribuibili a BCO (Wideman, 2016). Pertanto, alcuni animali sono stati alloggiati in condizioni di challenge su un pavimento metallico (le mangiatoie a tubo sono state posizionate nella parte anteriore e gli abbeveratoi nella parte posteriore del recinto, costringendo così gli uccelli ad attraversare la lunghezza del pavimento per mangiare e bere) per riprodurre meccanicamente la malattia; altri sono stati suddivisi in due gruppi (su lettiera di truciolo): Controllo: dieta non integrata; Trattamento: dieta di controllo integrata con 100 ppm Panbonis®101 durante l'intero periodo di 56 giorni (D0-56) o i primi 28 giorni (D0-28) e infettati per via aerea con *Staphylococcus spp*. per indurre la malattia. Gli uccelli zoppi sono stati rimossi e sottoposti a necroscopia. La presenza zoppia è stata registrata durante l'intero periodo di 56 giorni. I risultati sono illustrati nella Figura 3.

La percentuale cumulativa di zoppia negli animali in cui era stata indotta zoppia e il gruppo controllo infettato è stato simile e si è accumulata fino al 75-80%. Le diete integrate con *Solanum glaucophyllum* hanno fortemente ridotto la zoppia cumulativa a circa il 30%, mentre la somministrazione durante il periodo iniziale di 28 giorni ha mostrato un effetto simile a quella del trattamento durante l'intero periodo di 56 giorni. Wideman (2016) ha indicato che il BCO è causato dalla traslocazione batterica di *Staphylococcus spp* attraverso gli epiteli del tratto respiratorio e intestinale nei giovani polli da carne. Sulla base di questi promettenti risultati potrebbero essere testate le analogie con la malattia associata a *S. suis* nei suinetti.

Figura 3. Effetto di *Solanum glaucophyllum* sulla zoppia cumulativa di BCO causata da un'infezione da *Staphylococcus spp* trasmesso per via aerea nei polli da carne.



CONCLUSIONI

• *S. suis* è un normale abitante delle vie respiratorie superiori di tutti i suini, mentre l'incidenza delle malattie associate a S. suis è solitamente inferiore al 5%;

• È stato dimostrato in un modello murino che la disbiosi microbica nel tratto intestinale potrebbe aumentare la gravità dell'infezione da *S. suis* (presentata come "asse intestino-polmone"), suggerendo che lo svezzamento potrebbe consentire a *S. suis* di passare dalla colonizzazione commensale alla malattia nei suinetti;

• Le malattie associate a *S. suis* nei suinetti, sono spesso correlate ad altre co-infezioni batteriche e/o virali;

• Lo svezzamento è un chiaro fattore di rischio per la patogenizzazione di *S. suis*, a causa dei suoi effetti sulla disbiosi intestinale, sulla salute intestinale e sull'immunocompetenza;

• I dati sulle strategie nutrizionali per controllare le infezioni da *S. suis* nei suinetti svezzati sono scarsi. Tuttavia, le diete costruite per controllare la diarrea post-svezzamento nei suinetti potrebbero essere un buon punto di partenza;

• Le strategie nutrizionali dovrebbero concentrarsi su:

1) limitare la disbiosi microbica nel tratto intestinale;

2) effetti antimicrobici e/o antivirali diretti nelle vie respiratorie e intestinali;

3) miglioramento dell'immunocompetenza e/o del controllo delle reazioni infiammatorie sistemiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Canibe, N., O. Højberg, H. Kongsted, D. Vodolazska, C. Lauridsen, T. Skau Nielsen and A. A. Schönherz (2022). Animals 12:2585; doi.org/10.3390/ani12192585
2. Gottschalk, M. and M. Segura (2019). Streptococcus. In: Diseases of swine, vol 12. Wiley, pp 934-950
3. Hou, L., L. Wang, Y. Qiu, Y.X. Xiong, H. Xiao, H. Yi, X. Wen, Z. Lin, Z. Wang, X. Yang and Z. Jiang (2021). Effects of protein restriction and subsequent realimentation on body composition, gut microbiota and metabolite profiles in weaned piglets. Animals 11, 686; doi.org/10.3390/ani1103686
4. Huting, A.M.S., A. Middelkoop, X. Guan and F. Molist (2021). Using nutritional strategies to shape the gastro-intestinal tract of suckling and weaned piglets. Animals : 11, 402; doi.org/10.3390/ani11020402
5. Limbach, J.R., C.D. Espinosa, E. Perez-Calvo and H.H. Stein (2021). Effect of dietary crude protein level on growth performance, blood characteristics, and indicators of intestinal health in weanling pigs. Journal of Animal Science 93: 1-14; doi.org/10.1093/jas/skab166
6. Kil, D.Y. and H.H. Stein (2010). Invited review: Management and feeding strategies to ameliorate the impact of removing antibiotic growth promoters from diets fed to weaned pigs. Canadian Journal of Animal Science 90: 447-460; doi.org/10.4141/CJAS10028
7. Lun, Z.R., Q.P. Wang, X.G. Chen, A.X. Li and X.Q. Zhu (2007). Streptococcus suis: An emerging zoonotic pathogen. The Lancet Infectious Diseases 7: 201–209; doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70001-4
8. Neile-Ibáňez, C, S. Napp, L. Pailler-Garcia, L. Franco-Martínez, V. Aragon and J. Casal (2023). Risk factors associated with *Streptococcus suis* cases on pig farms in Spain. Vet Record; doi.org/10.1002/vetr.3056.

9. Obradovic, M.R., M. Segura, J. Segales and M. Gottschalk (2021). Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs. Veterinary Research 52:49; doi.org/10.1186/s13567-021-00918-w
10. Pié S., J.P. Lallès, F. Blazy, J. Laffitte, B. Sève and I.P. Oswald (2004). Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. Journal of Nutrition 134: 641–647. Doi.org/10.1093/jn/134.3.641
11. Segura, M., V. Aragon, S. L. Brockmeier, C. Gebhart, A. de Greeff, A. Kerdsin, M.A. O'Dea, M. Okura, M. Saléry, C. Schultsz, P. Valentin-Weigand, L.A. Weinert, J.M. Wells and M. Gottschalk (2020). Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. Suis*. Pathogens 9, 374; doi:10.3390/pathogens9050374
12. Tang, X., K. Xiong and R. Fang (2022). Weaning stress and intestinal health of piglets: A review. Frontiers in Immunology 13: 1042778; doi.org/10.3389/fimmu.2022.1042778
13. Wideman, R.F. (2016). Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: A review. Poultry Science 95:325-344
14. Yang, W.J., A.R. Ansari, X.Y. Niu, W.H. Zou, M.Q. Lu, L. Dong. F. Li, Y.H. Chen, K.L. Yang and H. Song (2022a). Interaction between gut microbiota dysbiosis and lung infection as gut-lung axis caused by *Streptococcus suis* in mouse model. Microbiological Research 261: 127047; doi.org/10.1016/j.micres.2022.127047
15. Yang, L., J. Wen, Y. Zhang, Z. Liu, Z. Luo, L. Xu, S. Lai, H. Tang, X. Sun, Y. Hu, L. Zhu and Z. Xu (2022b). The antiviral activity of caprylic monoglyceride against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro and in vivo. Molecules 27: 7263; doi.org/10.3390/molecules27217263
16. Zhang, Q. D. Yi, C. Ji, T. Wu, M. Wang, S. Guo, L. Wang, D. Zhao and Y. Hou (2022). Monolaurin confers a protective effect against virus infection in piglets by regulating the interferon pathway. Frontiers in Immunology 12: 797476; doi.org/10.3389/fimmu.2021.797476
17. Zheng, L., M.E. Duarte, A.S. Loftus and S.W. Kim (2021). Intestinal health of pigs upon weaning: Challenges and nutritional intervention. Frontiers in veterinary science 8: 628258; doi.org/10.3389/fvets.2021.628258

STREPTOCOCCUS SUIS IN ITALIA: ASPETTI EPIDEMIOLOGICI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA

MASSACCI F. R.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Dell'umbria E Delle Marche 'Togo Rosati'

Streptococcus suis è riconosciuto in tutto il mondo come uno dei più importanti agenti eziologici di malattia nei suinetti ed è associato a diverse manifestazioni cliniche quali meningite, artrite, endocardite o setticemia (Zimmerman et al., 2012). Si tratta anche di un microrganismo zoonotico responsabile di setticemia, endocardite e meningite nell'uomo (Zheng et al., 2018). Nelle aziende suinicole, le infezioni da *S. suis* sono una delle principali cause di utilizzo di antibiotici (REF). La limitata efficacia dei vaccini disponibili per *S. suis* rende gli antibiotici uno strumento chiave per il controllo delle infezioni sostenute da *S. suis* (Hadjirin et al., 2021).

A livello nazionale, le linee guida della Regione Emilia Romagna sull'uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino riassumono, con finalità operative, i punti critici e gli interventi volti ad indirizzare il corretto impiego degli antibiotici nell'allevamento suino. Vengono dunque fornite alcune indicazioni pratiche con un "albero decisionale" per la scelta degli antibiotici da utilizzare in corso delle principali malattie batteriche del suino, tra cui anche la streptococcosi. Tra gli antibiotici di I scelta abbiamo per la maggior parte le tetracicline, sulfamidici e i beta lattamici tra cui penicillina, ampicillina e cefalosporine di I e II generazione. Le linee guida riportano come *S. suis* sia generalmente sensibile a penicillina, aminopenicilline non potenziate e cefalosporine di I generazione, pertanto l'uso empirico (come prima scelta) di cefalosporine di III e IV generazione non è giustificato. In letteratura, numerosi lavori descrivono la sensibilità agli antibiotici di *S. suis*. I dati indicano una resistenza costante ed in alta percentuale per le tetracicline sia a livello europeo che italiano, sin dai primi anni '90 (Wasteson et al., 1994; Aarestrup et al., 1998; Marie et al., 2002; Vela et al., 2005; Wisselink et al., 2006; Hendriksen et al., 2008; Princivalli et al., 2009; Markowska-Daniel et al., 2010; Palmieri et al., 2011; de Jong et al., 2014). La resistenza alla classe dei sulfamidici risulta invece più variabile nella popolazione, così come la resistenza per altre classi con minor importanza clinica, come macrolidi e lincosamidi (Wisselink et al., 2006; Hendriksen et al., 2008; Markowska-Daniel et al., 2010; Tedde et al., 2016). Per quanto invece riguarda i beta lattamici, questi risultano efficaci nel controllo dell'infezione e tra questi sono riportate basse percentuali di resistenza alle penicilline, generalmente inferiori al 5% (Tedde et al., 2016). L'antibiotico-resistenza è spesso legata alla presenza di geni a trasmissione orizzontale. *S. suis* può contribuire alla diffusione di geni di antibiotico resistenza in ceppi umani di *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, e *S. agalactiae*, agendo come un vero e proprio *reservoir* (Princivalli et al., 2009; Palmieri et al., 2011). Questa ipotesi si basa sul fatto che *S. suis* porti con sé elementi genetici mobili simili a quelli presenti nelle specie batteriche sopra citate (Princivalli et al., 2009; Palmieri et al., 2011).

In Italia, nella pubblicazione di Cucco *et al*. (2022) sono stati caratterizzati i sierotipi (SS), i *sequence type* (ST) e la suscettibilità agli antibiotici di 78 isolati di *S. suis* da focolai di infezione verificatisi negli allevamenti di suini italiani nel periodo 2017-2019. Per quanto riguarda la sensibilità agli antimicrobici, in questo studio, è stata confermata la resistenza alla tetraciclina e alla clindamicina come già riportato in letteratura. La sensibilità ai sulfamidici e ai fluorochinoloni è generalmente più bassa nello studio rispetto a studi condotti in altri paesi Europei (van Hout et al., 2016). Infine è stato osservato un elevato livello di resistenza alla

penicillina con circa un isolato su cinque con una ridotta suscettibilità nei confronti di questa molecola. Non è stata riscontrata resistenza nei confronti di ampicillina, confermando l'ipotesi di una incompleta cross-resistenza tra questi due antimicrobici. Un ulteriore dato su cui porre l'attenzione è la resistenza riportata per florfenicolo in due isolati di *S. suis*. Il meccanismo di resistenza per i fenicoli è lo stesso per un'altra classe antibiotica, gli ossazolidinoni (Schwarz et al., 2021; Brenciani et al., 2022). Gli ossazolidinoni, linezolid e tedizolid, sono molecole utilizzate esclusivamente in medicina umana per le infezioni causate da batteri Gram positivi multi-resistenti (Schwarz et al., 2021; Brenciani et al., 2022). In letteratura risulta evidente che l'utilizzo di florfenicolo potrebbe promuovere, grazie a meccanismi di co-selezione, la diffusione non solo dei geni di resistenza per i fenicoli ma anche dei geni di resistenza agli ossazolidinoni con gravi conseguenze per la salute umana (Brenciani et al., 2022). A livello di determinanti genetici, il profilo più descritto era *tet*(O) ed *ermB*, determinanti genetici che codificano per la resistenza a tetracicline e macrolidi/lincosamidi (Cucco et al., 2022).
Al fine di capire se la resistenza alla penicillina fosse legata alla presenza di un clone emergente, si è indagata l'appartenenza al sierotipo (SS) e *sequence type* (ST) degli isolati mediante sequenziamento genetico in *whole genome*. È emerso che nella popolazione, SS2 e SS9 erano responsabili di quasi il 70% delle infezioni. Tra gli isolati appartenenti al SS2, rientravano gli ST1 e ST7, che è associato a gravi infezioni umane in Cina e che non è mai stato rilevato nei suini europei (Ye et al., 2008). Un'ampia percentuale (20%) di isolati SS9, assegnati a ST123, è risultato resistente alla penicillina. La resistenza a penicillina, a differenza di altre resistenze, sembra esser legata principalmente ad un clone diffuso in diverse regioni italiane. Questa tesi è stata confermata dal lavoro presentato al meeting annuale SIPAS da Bassi P. (2023) nel Marzo 2023. Venivano riportati i dati di sensibilità dei diversi patogeni estrapolati dai database di 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. Per quanto riguarda *S. suis*, veniva riportato circa il 13 % di resistenza alla penicillina e il SS9 risultava essere il sierotipo con il maggior numero di isolati resistenti e con una sensibilità intermedia per penicillina rispetto agli altri sierotipi. Lo stesso andamento nei confronti dei beta lattamici è stato descritto dal Sandri *et al.* nello stesso meeting annuale (Sandri G. et al., 2023).
I dati di altri gruppi di ricerca confermavano quindi un preoccupante aumento della resistenza di *S. suis*, ed in particolare di SS9, nei confronti della penicillina. Nel corso di un lavoro successivo (Massacci et al., 2023), si è approfondita l'origine e l'evoluzione della resistenza a penicillina in SS9. Il lavoro è stato condotto su 66 isolati di *S. suis* appartenenti al SS9 raccolti nell'arco di vent'anni (2002-2021). 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., 2016). Inoltre, ST16 e ST123 erano nettamente distinti sia in termini di fattori di patogenicità, sia come sensibilità ai beta lattamici. Tra gli ST123 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 differisce da ST123 per un singolo allele, e ST1540. 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. In particolare, il modello evidenzia un incremento annuo del valore di MIC per penicillina di circa il 4%. 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. 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 in SS9 si è progressivamente ridotta negli ultimi vent'anni e si è evoluta in alcuni cloni appartenenti a questo sierotipo.

Al fine di capire il meccanismo responsabile della resistenza alle penicilline, sono state studiate le proteine leganti la penicillina (*Penicillin Binding Protein,* PBP) che sono proteine coinvolte nella biosintesi della parete cellulare batterica. Le PBP rappresentano il principale bersaglio dei beta-lattamici, e le loro sostituzioni sono correlate ad un amento di resistenza per penicillina anche in altre specie di *Streptococcus* come ad esempio in *S. pneumoniae* (Zapun et al., 2008; Li et al., 2016; Dewé et al., 2019). Le PBP studiate in Massacci et al. (2023), sono state PBP1A, PBP1B, PBP2A, PBP2B, PBP2X. Il numero totale di mutazioni a livello delle PBP variava da 0, osservato in un isolato di cinghiale, a 152, riscontrate in un isolato ST1541 isolato nel 2017. La distribuzione delle sostituzioni tra gli isolati di *S. suis* non risultava casuale. Gli isolati infatti, si raggruppavano in base alle sostituzioni, rivelando un'architettura a mosaico delle PBP, già descritta in letteratura (Zapun et al., 2008). Specifici gruppi di sostituzioni a livello delle PBP sono stati correlati alla resistenza per penicillina, ceftiofur e ampicillina. È interessante notare che alcune sostituzioni che sono state trovate associate alla resistenza dei beta-lattamici sono state rilevate insieme anche da Bamphesin et al. (2021), che le ha descritte in isolati di *S. suis* di origine umana in Tailandia, 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 et al. (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)the penicillin-binding proteins (PBPs. La presenza di grandi blocchi di mutazioni nei 66 isolati suggerisce che anche *S. suis* possa avere acquisito questi gruppi di PBP da ceppi di *Streptococcus* spp. commensali, processo che è stato probabilmente favorito dalla pressione selettiva generata dall'uso di beta-lattamici nei suini.

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 che i valori di MIC nei confronti dei beta lattamici siano oggetto di una sorveglianza costante.

BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup, F.M., Rasmussen, S.R., Artursson, K., Jensen, N.E., 1998. Trends in the resistance to antimicrobial agents of Streptococcus suis isolates from Denmark and Sweden. Vet. Microbiol. 63, 71–80. doi:10.1016/s0378-1135(98)00228-4

2. Bamphensin, N., Chopjitt, P., Hatrongjit, R., Boueroy, P., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Kerdsin, A., 2021. Non-Penicillin-Susceptible Streptococcus suis Isolated from Humans. Pathog. (Basel, Switzerland) 10. doi:10.3390/pathogens10091178
3. Bassi, P., 2023. Antibioticoresistenza dei patogeni batterici del suino e possibilità terapeutiche: la situazione attuale. Atti della Soc. Ital. di Patol. e Allev. del suino XLVIII Meet. Annu. SIPAS.
4. 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. Int. Microbiol. Off. J. Spanish Soc. Microbiol. 12, 161–166.
5. 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
6. Chagneau, C. V, Alcouffe, O., Grare, M., Oswald, E., Massip, C., 2022. Screening for β-lactam resistance by penicillin G in the Streptococcus anginosus group challenged by rare strains with altered PBPs. J. Antimicrob. Chemother. 77, 1847–1850. doi:10.1093/jac/dkac139
7. 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. Emerg. Infect. Dis. 28, 139–147. doi:10.3201/eid2801.210816
8. de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., El Garch, F., Maher, K., Morrissey, I., Butty, P., Klein, U., Marion, H., Rigaut, D., Vallé, M., 2014. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. Vet. Microbiol. 172, 202–215. doi:10.1016/j.vetmic.2014.04.008
9. Dewé, T.C.M., D'Aeth, J.C., Croucher, N.J., 2019. Genomic epidemiology of penicillin-non-susceptible Streptococcus pneumoniae. Microb. genomics 5. doi:10.1099/mgen.0.000305
10. 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.(. D., Hoa, N.T., Welch, J.J., Weinert, L.A., 2021. Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen Streptococcus suis. BMC Biol. 19, 191. doi:10.1186/s12915-021-01094-1
11. Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Jouy, E., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K.D.C., Berghold, C., Myllyniemi, A.-L., Hoszowski, A., Sunde, M., Aarestrup, F.M., 2008. Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 - 2004: the ARBAO-II study. Acta Vet. Scand. 50, 19. doi:10.1186/1751-0147-50-19
12. Li, Y., Metcalf, B.J., Chochua, S., Li, Z., Gertz, R.E.J., Walker, H., Hawkins, P.A., Tran, T., Whitney, C.G., McGee, L., Beall, B.W., 2016. Penicillin-Binding Protein Transpeptidase Signatures for Tracking and Predicting β-Lactam Resistance Levels in Streptococcus pneumoniae. MBio 7. doi:10.1128/mBio.00756-16
13. Marie, J., Morvan, H., Berthelot-Hérault, F., Sanders, P., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A. V., Jouy, E., Kobisch, M., 2002. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus suis isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. J. Antimicrob. Chemother. 50, 201–209. doi:10.1093/jac/dkf099

14. Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Stepniewska, K., Pejsak, Z., 2010. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from respiratory tract of pigs in Poland between 2004 and 2008. Pol. J. Vet. Sci. 13, 29–36.
15. Massacci, F.R., Cucco, L., Panicciá, M., Luppi, A., Albini, E., Peruzzo, A., Ferroni, L., Ustulin, M., Orsini, M., Magistrali, C.F., 2023. Streptococcus suis serotype 9 in Italy: genomic insights into high-risk clones with emerging resistance to penicillin . J. Antimicrob. Chemother. 79, 403–411. doi:10.1093/jac/dkad395
16. Palmieri, C., Varaldo, P.E., Facinelli, B., 2011. Streptococcus suis, an emerging drug-resistant animal and human pathogen. Front. Microbiol. 2, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2011.00235
17. Princivalli, M.S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., Magistrali, C., Facinelli, B., 2009. Genetic diversity of Streptococcus suis clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003-2007). Euro Surveill. 14, 1–7. doi:10.2807/ese.14.33.19310-en
18. Sandri G., Giovanardi D., Ortali G., D.B.M., 2023. Importanza del monitoraggio nel tempo dell'antibiotico- sensibilità dei principali patogeni del suino: 20 anni di esperienza in filiera. Atti della Soc. Ital. di Patol. e Allev. del suino XLVIII Meet. Annu. SIPAS.
19. Schwarz, S., Zhang, W., Du, X.-D., Krüger, H., Feßler, A.T., Ma, S., Zhu, Y., Wu, C., Shen, J., Wang, Y., 2021. Mobile Oxazolidinone Resistance Genes in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 34, e0018820. doi:10.1128/CMR.00188-20
20. Tedde, M.T., Pilo, C., Frongia, M., et, a., 2016. Antimicrobial resistance and virulence factors of Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in southern Italy (Sardinia). J. Swine Heal. Prod. 24, 253–258.
21. van Hout, J., Heuvelink, A., Gonggrijp, M., 2016. Monitoring of antimicrobial susceptibility of Streptococcus suis in the Netherlands, 2013–2015. Vet. Microbiol. 194, 5–10. doi:10.1016/j.vetmic.2016.03.014
22. Vela, A.I., Moreno, M.A., Cebolla, J.A., González, S., Latre, M. V, Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2005. Antimicrobial susceptibility of clinical strains of Streptococcus suis isolated from pigs in Spain. Vet. Microbiol. 105, 143–147. doi:10.1016/j.vetmic.2004.10.009
23. Wasteson, Y., Høie, S., Roberts, M.C., 1994. Characterization of antibiotic resistance in Streptococcus suis. Vet. Microbiol. 41, 41–49. doi:10.1016/0378-1135(94)90134-1
24. 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. Sci. Rep. 6, 1–12. doi:10.1038/srep28984
25. Wisselink, H.J., Veldman, K.T., Van den Eede, C., Salmon, S.A., Mevius, D.J., 2006. Quantitative susceptibility of Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. Vet. Microbiol. 113, 73–82. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.035
26. Ye, C., Bai, X., Zhang, J., Jing, H., Zheng, H., Du, H., Cui, Z., Zhang, S., Jin, D., Xu, Y., Xiong, Y., Zhao, A., Luo, X., Sun, Q., Gottschalk, M., Xu, J., 2008. Spread of Streptococcus suis sequence type 7, China. Emerg. Infect. Dis. 14, 787–791. doi:10.3201/eid1405.070437
27. Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T., 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. FEMS Microbiol. Rev. 32, 361–385. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x

28. 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. Vet. Res. 49, 1–13. doi:10.1186/s13567-017-0498-2
29. Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G., 2012. Disease of Swine, 10th ed. Wiley-Blackwell.

IMPIEGO DELLA VACCINAZIONE NEL CONTROLLO DELLA STREPTOCOCCOSI DEL SUINO: ESPERIENZE DI CAMPO

VEZZOLI F.

Lo Streptococcus suis (*S. suis*) è uno dei più importanti patogeni batterici del suino che colpisce i suinetti nel post-svezzamento causando principalmente meningite, artrite e morte improvvisa. Non solo provoca gravi perdite economiche, ma solleva anche preoccupazioni sul benessere degli animali e sulla resistenza antimicrobica. Da non sottovalutare il potenziale zoonosico di *S. suis* con il rischio maggiore per le persone che hanno stretto contatto con suini come allevatori, addetti all'allevamento di suini, macellai e veterinari.
S. suis è un batterio incapsulato e la diversità antigenica del polisaccaride capsulare è alla base della classificazione batterica in 29 sierotipi. I principali sierotipi isolati da animali con manifestazioni cliniche sono i sierotipi 2 e 9.
S. suis colonizza asintomaticamente il tratto respiratorio superiore, l'intestino e i genitali dei suini, come parte del normale microbiota. I suinetti si infettano tramite trasmissione orizzontale e verticale, causata rispettivamente dal contatto naso-naso e dal contatto naso-vagina durante il parto. Le manifestazioni cliniche si osservano quando *S. suis* penetra nelle barriere della mucosa e accede al flusso sanguigno, alle articolazioni e al sistema nervoso centrale, causando così una varietà di sintomi come setticemia, endocardite, artrite, polmonite e morte improvvisa
Da oltre tre decenni vengono usati antimicrobici per controllare le infezioni da *S. suis*, queste sono una delle principali cause dell'uso di antimicrobici nell' allevamento suino, in particolare nel post svezzamento sia a scopo terapeutico che (ove consentito) profilattico/metafilattico. La mancanza di vaccini efficaci per prevenire la malattia ha favorito l'ampio uso di antibiotici in tutto il mondo. La loro efficacia è notevolmente diminuita negli anni a seguito dell'acquisizione di resistenze, come segnalato da diversi autori (Bassi P. 2022, Sandri et al., 2023, Cucco et al., 2023). *S. suis* è considerato uno dei più importanti agenti batterici infettivi del settore suino, e quindi di importanza strategica viste le nuove normative che impongono restrizioni all'uso di sostanze antimicrobiche. Al fine di ridurre l'uso degli antimicrobici nella produzione animale, i sistemi produttivi sottolineano l'importanza di migliorare i vaccini esistenti e/o sviluppare nuove strategie di vaccinazione.
La prevenzione della malattia da *S. suis* dovrebbe concentrarsi sulla gestione dei fattori predisponenti (Neila-Ibáñez C. et al 2023) e soprattutto sulla vaccinazione. Finora non è stato possibile sviluppare vaccini commerciali universali ed efficaci, a causa della presenza di un elevato numero di sierotipi (senza protezione crociata l'uno contro l'altro). Al momento in Italia è registrato un solo vaccino commerciale per *S. Suis* ma esclusivamente nei confronti del sierotipo 2. Gli unici vaccini disponibili utilizzati in condizioni di campo, quando presenti diversi sierotipi, sono i vaccini stabulogeni definiti dal regolamento EU 2016/6 come *"Medicinali veterinari immunologici inattivati fabbricati a partire da agenti patogeni e antigeni ottenuti da uno o più animali di un'unità epidemiologica e utilizzati per il trattamento di detto animale o animali della stessa unità epidemiologica o per il trattamento di uno o più animali in un'unità epidemiologica rispetto ai quali è stata confermata l'esistenza di una relazione epidemiologica",* prodotti da laboratori autorizzati.
Questi vaccini sono preparati specificatamente per ogni allevamento, realizzati a partire da campioni patologici provenienti dai suini dell'allevamento stesso. In questo modo i suini vaccinati sono protetti contro lo/gli stesso/i ceppo/i presenti che causano i sintomi clinici nell'allevamento.
Nella produzione dei vaccini stabulogeni è essenziale per prima cosa una corretta diagnosi eziologica che andrebbe sempre eseguita a seguito del sospetto clinico del veterinario aziendale.

Nel caso di *S. suis* risulta molto utile eseguire la diagnosi su più animali preferendo gli isolamenti da cervello; mentre, per quanto riguarda gli isolati ottenuti dai polmoni, poiché sono considerati infezioni secondarie, non dovrebbero essere inclusi nella composizione del vaccino (Obradovic et al., 2021). Risulta quindi consigliato eseguire sempre la tipizzazione dei ceppi isolati, al fine di comprendere una loro potenziale evoluzione e diversificazione al fine di adattare il vaccino stabulogeno ai sierotipi circolanti in allevamento; difatti, nel seguente presidio immunizzante è possibile introdurre fino a tre ceppi diversi.
La protezione fornita dai vaccini stabulogeni è ceppo specifica e spesso imprevedibile. I principali inconvenienti associati sono:

1. elevata diversità di antigeni prodotti dai ceppi di *S. suis*;
2. perdita della struttura di molti antigeni durante l'inattivazione cellulare richiesta per la produzione;
3. necessitano di un costante monitoraggio dei soggetti sintomatici indispensabile per individuare precocemente l'ingresso di sierotipi non coperti dal vaccino in uso.

In campo i vaccini stabulogeni vengono somministrati ai suinetti allo svezzamento e il richiamo eseguito a distanza di 15 giorni; in alternativa la vaccinazione viene eseguita a tre giorni di vita e ripetuta allo svezzamento (Ustulin et al., 2023), tuttavia, senza che vi siano dati sulla loro capacità di indurre una risposta immunitaria, e molto probabilmente in presenza di anticorpi materni. Un'alternativa alla vaccinazione dei suinetti consiste nell'immunizzazione delle scrofe prima del parto al fine di stimolare l'immunità materna passiva. Quest'ultimo protocollo è meno costoso e rappresenta un'alternativa economica alla vaccinazione dei suinetti. Tuttavia, pochissimi studi hanno affrontato la durata dell'immunità materna nei suinetti soprattutto considerando che la maggior parte dei casi clinici causati da *S. suis* si verificano nel periodo post-svezzamento.
Come valutare l'efficacia del vaccino?
I diversi sierotipi e ceppi di *S. suis*, un'ampia varietà di adiuvanti e metodi di produzione rendono difficile la valutazione dell'efficacia dei vaccini stabulogeni; inoltre, non sempre le prove di campo sono condotte in modo scientifico. Uno strumento pratico e utile per valutarne l'efficacia potrebbe essere la diminuzione dell'utilizzo degli antimicrobici in allevamento mediante l'utilizzo del Sistema ClassyFarm. Difatti, nella pratica gestionale degli allevamenti le variabili che subentrano ad interferire in una corretta e scientifica valutazione dei differenti protocolli vaccinali spesso fa si che i dati raccolti abbiano dei bias rilevanti. Monitorare l'uso degli antimicrobici espressi in DDD, in particolare per le molecole utilizzate al fine di gestire le problematiche da *S. suis*, come ad esempio le amminopenicilline, possono aiutare a comprendere l'effettiva efficacia del vaccino. Così come i risultati del continuo monitoraggio diagnostico dei casi clinici con i dati di sierotipizzazione e di antimicrobico suscettibilità, prossimamente disponibili sul medesimo sistema. Per questo tipo di approccio immunizzante è quindi necessario un percorso medio-lungo con un continuo monitoraggio.

BIBLIOGRAFIA

1. P. Bassi. Antibioticoresistenza dei patogeni batterici del suino e possibilità terapeutiche: la situazione attuale. (2022) ATTI DEL XLVII MEETING ANNUALE SIPAS, 39-51
2. Cucco L., Massacci F.R., Paniccià M., Luppi A., Albini E., Ferroni L., Ustulin M., Peruzzo A., Orsini M., Magistrali C.F. Diffusione di cloni di Streptococcus suis sierotipo 9 caratterizzati da una ridotta sensibilità ai beta lattamici in Italia. (2023) ATTI DEL XLVIII MEETING ANNUALE SIPAS, 116-126
3. Neila-Ibáñez C, Napp S, Pailler-García L, Franco-Martínez L, Cerón JJ, Aragon V, et al. Risk factors associated with *Streptococcus suis* cases on pig farms in Spain. (2023) Veterinary Record; e3056

4. Obradovic M. R., Segura M., Segalés J., Gottschalk M.. Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs (2021). Veterinary Research, 52: 49.
5. Sandri G., Giovanardi D., Ortali G., Dalla Bona M.. Importanza del monitoraggio nel tempo dell'antibioticosensibilità dei proincipali patogeni del suino: 20 anni di esperienza in filiera. (2023) ATTI DEL XLVIII MEETING ANNUALE SIPAS, 111-115
6. Ustulin M., Giorgiutti M., Gagliazzo L., Paniccia' M., Cucco L., Severi G., Tagliente D., Ghiriti A., Vio D.. Valutazione preliminare di un protocollo di vaccinazione precoce con vaccino stabulogeno contro Streptococcus suis. (2022) ATTI DEL XLVII MEETING ANNUALE SIPAS, 97-102.

ATTI DEL XLIX MEETING ANNUALE

Desenzano (BS), 18-19 April 2024

UTILIZZO DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI E DI ALTRE MATRICI INNOVATIVE PER IL MONITORAGGIO DEL VIRUS DELLA PRRS

USE OF PROCESSING FLUIDS AND OTHER NOVEL SAMPLES FOR PRRS MONITORING

USTULIN M.

Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie – Laboratorio di Patologia e Benessere della Specie Suina – Sezione Territoriale di Pordenone

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino è una delle più diffuse patologie del suino ed è causa di gravi perdite economiche per il comparto suinicolo; in Italia si stima una prevalenza di aziende infette di circa il 90% (Franzo *et al*, 2021). La gestione della patologia si focalizza soprattutto sul controllo della circolazione virale nelle aziende da riproduzione per ottenere la stabilizzazione delle scrofaie.
Sulla base della circolazione di PRRS, un allevamento da riproduzione può essere classificato come:

- Positivo instabile ad alta prevalenza (<75% delle bande svezzate risultano negative)
- Positivo instabile a bassa prevalenza (>75% delle bande svezzate risultano negative)
- Positivo stabile o positivo stabile con vaccinazione (100% delle bande svezzate risultano negative al ceppo di campo)
- Provvisoriamente negativo (Assenza di sieroconversione nelle rimonte per almeno 60 giorni)
- Negativo (Assenza di riproduttori positivi a test anticorpali)

Secondo quanto descritto da Holtkamp *et al*. nel 2011, nei piani di campionamento finalizzati alla classificazione delle scrofaie, per verificare la circolazione del virus è necessario analizzare i campioni di siero di 30 suinetti in età di svezzamento in pool di 5 tramite metodiche con sensibilità analitica superiore al 95%. La numerosità campionaria di tale protocollo di campionamento permette, a fronte di una prevalenza attesa del 10%, di evidenziare il target con il 95% di confidenza. Tali piani di campionamento sono stati basati sugli assunti per i quali i virus della PRRS non possano mantenersi in azienda ad una prevalenza inferiore al 10% per un periodo superiore ai 90 giorni e che la circolazione del virus nei riproduttori possa essere dimostrata evidenziando la presenza di PRRSV nei suinetti sottoscrofa poco prima dello svezzamento.
Nella realtà pratica, il protocollo si è dimostrato non sempre adeguato, sono stati infatti documentati casi di ricircolazione di PRRSV dopo aver raggiunto lo status di azienda stabile (Linhares *et al* 2014); sono inoltre stati segnalati casi in cui l'infezione da PRRSV si sia mantenuta a prevalenze inferiori al 10%, suggerendo la necessità di fare ricorso ad un numero più elevato di campioni, con conseguente aumento sia dei costi di analisi che del tempo da dedicare alla raccolta dei campioni.
Per quanto il siero di sangue possa ancora essere considerato la matrice ideale per evidenziare la presenza del virus della PRRS, anche considerato che presenta caratteristiche ottimali per essere utilizzato anche per studi epidemiologici avanzati (NGS), per identificare almeno un campione positivo con una prevalenza di soggetti infetti inferiore al 5% è necessario aumentare in modo significativo il numero di campioni da raccogliere (vedi tabella 1).

	Percentuale di soggetti malati nella popolazione						
Dimensioni della popolazione	50%	40%	25%	10%	5%	2%	1%
10	4	5	7	10	10	10	10
20	4	6	9	16	19	20	20
30	4	6	9	19	26	30	30
40	5	6	10	21	31	40	40
50	5	6	10	22	35	48	50
100	5	6	10	25	45	78	96
200	5	6	11	27	51	105	155
500	5	6	11	28	56	129	225
1000	5	6	11	29	57	138	258
5000	5	6	11	29	59	147	290
10000	5	6	11	29	59	148	294
∞	5	6	11	29	59	149	299

Tabella 1: Numerosità campionaria per individuare almeno un soggetto positivo in base alla prevalenza attesa e dimensioni della popolazione con una confidenza del 95%

In base agli studi effettuati e al miglioramento delle conoscenze in merito all'utilizzo di campioni aggregati l'American Association of Swine Veterinarians sta rivedendo i criteri di classificazione degli allevamenti in base allo stato di circolazione della PRRS, e tra le modifiche che hanno trovato consenso, a supporto del prelievo di 30 (nel caso di alta prevalenza attesa, >10%) o 60 (nel caso di bassa prevalenza attesa,<10%) campioni di siero di suinetti al momento dello svezzamento, vi è l'introduzione dell'uso di campioni aggregati, tra cui gli emosieri testicolari (Holtkamp *et al.* 2021).
L'utilizzo di campioni aggregati per verificare la circolazione di agenti eziologici in allevamento è ormai entrata nella routine. I campioni aggregati più utilizzati sono i fluidi orali, i fluidi orali familiari, gli emosieri testicolari. Di recente un'ulteriore opzione è data dalle lingue (tongue tips).
Ciascuno di questi campioni presenta vantaggi e svantaggi ma, se gestiti correttamente, possono essere un valido supporto per il monitoraggio di diverse patologie.
In particolare, gli emosieri testicolari, ovvero i liquidi di percolamento dei tessuti raccolti durante le operazioni di castrazione e taglio della coda, possono essere efficacemente sfruttati per il monitoraggio della PRRS in scrofaia in associazione a campioni di siero di sangue o ad altri campioni aggregati.
Oltre al virus della PRRS, gli emosieri testicolari sono stati utilizzati per la ricerca di *Mycoplama hyopneumoniae* (Vilalta 2019), *M. hyorhinis* (Ustulin *et al*, 2020), PCV2 (Fan M. *et al*, 2023) e Senecavirus A (Preis *et al*, 2024)

Per quanto concerne la PRRS, studi di campo e su base aziendale, hanno evidenziato per gli emosieri testicolari una sensibilità maggiore o comparabile a campioni di siero di sangue in pool da 5 analizzati con metodiche biomolecolari (Lopez *et al*., 2018 e 2021, Ustulin *et al*., 2019). Sono inoltre state pubblicate, in anni recenti, esperienze di successo nell'utilizzo degli emosieri testicolari per il monitoraggio della PRRS e la per la classificazione delle aziende in funzione dello *status* della PRRS (Trevisan *et al,* 2019, Almeida *et al*., 2021, Lopez *et al*., 2021, Tonni *et al*. 2023).
Nell'utilizzo di campioni aggregati è necessario tenere in considerazione che, se da una parte includere nel campionamento un maggior numero di soggetti permetta di aumentare la sensibilità dell'analisi a livello aziendale, dall'altra, soprattutto per le aziende in cui la prevalenza di PPRSV è bassa, la diluizione del campione può diminuire la concentrazione virale, riducendola al di sotto del limite di sensibilità della metodica analitica.
I dati bibliografici disponibili indicano che è sufficiente la presenza di organi (testicoli) e tessuti (coda) di un solo maschio positivo, con carica virale alta (Ct 22,1), in un campione composto da 50 nidiate per avere un risultato in real time PCR positivo sul campione aggregato. In caso di un singolo maschio positivo, ma con carica virale bassa (Ct 33,6) il campione aggregato di 50 nidiate risulterà negativo, ma risulterà positivo un campione aggregato di 40 nidiate che includa tale soggetto. Lo stesso studio indica che il contributo dato dalle femmine, è molto limitato in quanto i tessuti muscolare e scheletrico di cui è composta la coda forniscono una quantità di liquido nettamente inferiore alla coppia di testicoli. In presenza di una sola femmina debolmente positiva (Ct 34,3) come unico soggetto positivo del campione aggregato, le analisi in real time PCR forniscono un risultato negativo anche includendo solo 10 nidiate (Vilalta *et al*. 2019).
Per una stima adeguata del numero massimo di nidiate da includere e quindi per definire correttamente le dimensioni del campione aggregato è necessario avere a priori una stima della prevalenza attesa. In aziende stabili o prossime alla stabilità, in cui ci si aspetta una prevalenza molto bassa sarà opportuno ridurre il numero di nidiate incluse nel campione aggregato per evitare eccessiva diluizione. Un recente studio (Lopez *et al.*, 2021) ha evidenziato una probabilità dell'80% di identificare come positivo un campione aggregato costituito da 43 nidiate negative e una positiva, ma tale probabilità scende al 43% se nel campione vengono incluse 69 nidiate. In situazione numeriche più simili alle tipologie di allevamento italiane, qualora il campione aggregato sia costituito da 28 nidiate negative e una positiva la probabilità di identificare come positivo il campione aggregato è del 95%.
Potendo essere raccolti solo nei primi giorni di vita, l'utilizzo degli emosieri testicolari per il monitoraggio della PRRS permette di verificare la circolazione virale solo in una breve finestra temporale.
I fluidi orali familiari e i pool di lingue (tongue tips) sono campioni aggregati che possono essere utilizzati nelle altre fasi di vita del suinetto.
I fluidi orali familiari (FOF) vengono raccolti posizionando una corda in cotone nella gabbia parto in modo che vi abbiano accesso sia la scrofa che i suinetti, il comportamento esplorativo della scrofa incoraggia i suinetti a contribuire alla composizione del campione. Perché i suinetti possano efficacemente contribuire devono avere almeno 18 giorni, questo metodo di campionamento può quindi essere utilizzato per verificare la circolazione di virus della PRRS poco prima dello svezzamento.
L'utilizzo dei FOF permette di ridurre il numero di campioni da analizzare rispetto all'utilizzo dei sieri, pur mantenendo una buona sensibilità diagnostica anche a prevalenze basse, ad esempio a fronte di una prevalenza del 3% per identificare almeno un soggetto positivo con un livello di confidenza del 95% sarebbe necessario analizzare il siero di 90 soggetti oppure, in alternativa, 10 FOF (Almeida *et al*. 2019). Questa differenza è resa ancora

più conveniente dalla possibilità di analizzare in pool anche i FOF (Osemeke *et al*, 2022). Un'ulteriore tipologia di campione aggregato ancora poco utilizzato in Italia ma su cui sono disponibili promettenti dati bibliografici è dato da pool di lingue di suinetti deceduti. Per evidenziare la circolazione di PRRS in una banda è infatti possibile raccogliere le lingue dei soggetti deceduti dalla nascita fino allo svezzamento conservandole in congelamento in uno stesso contenitore. Il laboratorio potrà poi analizzare il liquido di percolamento costituito da sangue e saliva. Per ottenere un campione rappresentativo è necessario prelevare almeno 2-3 cm di lingua per ogni soggetto deceduto indipendentemente dalla causa della morte. Dati bibliografici suggeriscono una buona concordanza tra l'analisi di pool di tongue tips e l'analisi dei sieri di sangue, spesso con il riscontro di valori di Ct della rel time PCR più bassi (Machado *et al*., 2022).

Nell'insieme, l'utilizzo di campioni aggregati può rappresentare una valida alternativa al campionamento di campioni ematici, sia in termini di minor lavoro per la raccolta sia per la necessità di analizzare un numero di campioni più contenuto che include un maggior numero di animali.
Il piano di campionamento ai fini della sorveglianza della PRRS deve comunque sempre essere calato nella realtà aziendale, tenendo conto di fattori quali il numero di animali nel gruppo e la prevalenza attesa. Deve essere tenuto presente che la distribuzione intra-aziendale del virus della PRRS non è uniforme e che pertanto la prevalenza intra-aziendale può variare tra sale parto, capannoni e bande: In ultimo si evidenzia che il monitoraggio deve essere costante e ripetuto nel tempo mantenendo la numerosità campionaria definita al fine di poter garantire di evidenziare precocemente eventuali variazioni della prevalenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida MN, Rotto H, Schneider P, Robb C, Zimmerman JJ, Holtkamp DJ, Rademacher CJ, Linhares DCL. Collecting oral fluid samples from due-to-wean litters. Prev Vet Med. 2020 Jan;174:104810. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104810. Epub 2019 Nov 4. PMID: 31756669.
2. Almeida MN, Zhang M, Lopez WAL, Vilalta C, Sanhueza J, Corzo CA, Zimmerman JJ, Linhares DCL. A comparison of three sampling approaches for detecting PRRSV in suckling piglets. Prev Vet Med. 2021 Sep;194:105427. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105427. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34271476.
3. Franzo, G.; Barbierato, G.; Pesente, P.; Legnardi, M.; Tucciarone, C.M.; Sandri, G.; Drigo, M. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Epidemiology in an Integrated Pig Company of Northern Italy: A Multilevel Threat Requiring Multilevel Interventions. Viruses **2021**, 13, 2510.
4. Fan M, Bian L, Tian X, Hu Z, Wu W, Sun L, Yuan G, Li S, Yue L, Wang Y, Wu L, Wang Y, Yan Z, Ren J, Li X. Infection characteristics of porcine circovirus type 2 in different herds from intensive farms in China, 2022. Front Vet Sci. 2023 Jun 15;10:1187753. doi: 10.3389/fvets.2023.1187753. PMID: 37397003; PMCID: PMC10311082.
5. Holtkamp D, Polson D, Torremorell M, Morrison R, Classen D, Becton L, Henry S, Rodibaugh MT, Rowland RR, Snelson H, Straw B, Yeske P, Zimmerman J. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Health Prod*. 2011;19:44-56.
6. Holtkamp D, Torremorell M, Corzo CA, Linhares DCL, Almeida MN, Yeske P, Polson DD, Becton L, Snelson H, Donovan T, Pittman J, Johnson C, Vilalta C, Silva GS, Sanhueza J. Proposed modifications to porcine reproductive and respiratory syndrome virus herd classification. *J Swine Health Prod*. 2021;29(5):261-270.

7. Linhares DC, Cano JP, Torremorell M, Morrison RB. Comparison of time to PRRSv-stability and production losses between two exposure programs to control PRRSv in sow herds. Prev Vet Med. 2014 Sep 1;116(1-2):111-9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.05.010. Epub 2014 Jun 2. PMID: 24931129.
8. López WA, Angulo J, Zimmerman JJ, Porcine Reproductiv and Respiratory Syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. J Swine Health Prod. 2018;26(3):146-150.
9. López WA, Zimmerman JJ, Gauger PC, Harmon KM, Bradner L, Zhang M, Giménez-Lirola L, Ramirez A, Cano JP, Linhares DCL. Practical aspects of PRRSV RNA detection in processing fluids collected in commercial swine farms. Prev Vet Med. 2020 Jul;180:105021. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105021. Epub 2020 May 4. PMID: 32428814.
10. López WA, Gauger PC, Harmon KM, Holtkamp DJ, Cano JP, Macedo N, Zhang M, Silva GS, Angulo J, Zimmerman JJ, Linhares DCL. Probability of PRRS virus detection in pooled processing fluid samples. Vet Microbiol. 2021 Oct;261:109190. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109190. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34411996.
11. Machado IF, Magalhães ES, Poeta Silva APS, Moraes DCA, Cezar G, Mil-Homens MP, Osemeke OH, Paiva R, Moura CAA, Gauger P, Trevisan G, Silva GS, Linhares DCL. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA detection in tongue tips from dead animals. Front Vet Sci. 2022 Sep 21;9:993442. doi: 10.3389/fvets.2022.993442. PMID: 36213411; PMCID: PMC9533096.
12. Osemeke OH, de Freitas Costa E, Almeida MN, Trevisan G, Ghosh AP, Silva GS, Linhares DCL. Effect of pooling family oral fluids on the probability of PRRSV RNA detection by RT-rtPCR. Prev Vet Med. 2022 Sep;206:105701. doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105701. Epub 2022 Jul 3. PMID: 35816833.
13. Preis G, Benjamin NR, Murray D, Taylor EB, Copeland S, Allison G, Corzo CA. First assessment of weeks-to-negative processing fluids in breeding herds after a Senecavirus A outbreak. Porcine Health Manag. 2024 Jan 5;10(1):2. doi: 10.1186/s40813-023-00353-7. PMID: 38183156; PMCID: PMC10768445.
14. Tonni, M.; Romeo, C.; Formenti, N.; Boniotti, M.B.; Guarneri, F.; Colosio, L.; Andreoni, S.; Scali, F.; Alborali, G.L. PRRS Monitoring by Processing Fluids on Italian Swine Breeding Farms. Animals **2023**, 13, 1946. https://doi.org/10.3390/ani13121946
15. Trevisan G, Jablonski E, Angulo J, Lopez WA, Linhares DCL. Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. Porcine Health Manag. 2019 Aug 1;5:18. doi: 10.1186/s40813-019-0125-x. PMID: 31388438; PMCID: PMC6670174.
16. Ustulin,M.; Tonon,F.; Lombardo,F.; Giorgiutti,M.; Targhetta,C.; Toffoletto,M.; Tagliente,D; Vio,D. Emosieri testicolari: una matrice innovativa per il monitoraggio della PRRS negli allevamenti da riproduzione. 2019, XIX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Volume degli Abstract Atti 2019, 67-68, Matera, Italy
17. Ustulin M., Rossi E., Targhetta C., Caporal A., Vio D. Risultati preliminari dello studio di valutazione degli emosieri come matrice per la ricerca di micoplasmi. 2021, Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XLVI Meeting Annuale pp. 207-210, Pescantina (VR)
18. Vilalta C, Sanhueza J, Alvarez J, Murray D, Torremorell M, Corzo C, Morrison R. Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs. Vet Microbiol. 2018 Nov;225:149-156. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.09.006. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30293648.

19. Vilalta C, Sanhueza JM, Murray D, Johnson L, Pieters M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglet processing fluids. Vet Rec. 2019 Oct 26;185(16):510. doi: 10.1136/vr.105475. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31409755.
20. Vilalta C, Baker J, Sanhueza J, Murray D, Sponheim A, Alvarez J, Sylvia F, Polson D, Torremorell M, Corzo C, Morrison RB. Effect of litter aggregation and pooling on detection of porcine reproductive and respiratory virus in piglet processing fluids. J Vet Diagn Invest. 2019 Jul;31(4):625-628. doi: 10.1177/1040638719852999. Epub 2019 May 23. PMID: 31122156; PMCID: PMC6857019.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL *NEXT-GENERATION SEQUENCING* DI PRRSV DA UN PUNTO DI VISTA EPIDEMIOLOGICO

TREVISAN G., ZELLER M., GAUGER P., ZHANG J., LI G., LINHARES D.

Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, Iowa State University, Ames, IA

Il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRSV) è stato descritto e isolato contemporaneamente in Europa e in Nord America intorno agli anni '90 e il suo genoma ha una lunghezza variabile tra 14,9 e 15,5 Kb (1, 2). PRRSV è classificato in due specie distinte: a) *Betaarterivirus suid 1*, noto come PRRSV-1 o tipo europeo, che ha come prototipo il genoma Lelystad (GenBank NC_043487.1) (3-5), e b) *Betaarterivirus suid 2*, noto come PRRSV-2 o tipo nordamericano, che ha come prototipo il genoma VR2332 (GenBank U87392.3) (2, 6, 7).

Entrambe le specie sono distribuite a livello globale, con il PRRSV-1 più frequentemente rilevato in Europa e il PRRSV-2 nelle Americhe e in Asia. Entrambe le specie sono presenti negli Stati Uniti (8). L'indagine epidemiologica di PRRSV si è basata sul sequenziamento genetico di geni specifici, come l'open reading frame 5 (ORF5) o l'ORF7. L'ORF5 comprende 603 o 606, e l'ORF7 387 o 372 paia di basi per i ceppi prototipo PRRSV-1 e PRRSV-2, rispettivamente, e rappresenta circa il 4% e il 2,5% dell'intero genoma del PRRSV di ciascuna specie. Negli Stati Uniti, l'ORF5 è stato utilizzato per classificare le sequenze di PRRSV in base al polimorfismo di lunghezza del frammento di restrizione (RFLP) (9) e ai lineaggi (10-13).

Il sequenziamento di ORF5 e ORF7 si basa sulla tecnica di sequenziamento Sanger (14) o a sue successive modifiche (15). La tecnica Sanger ha tempi di esecuzione brevi e produce una sequenza di consenso. Tuttavia, presenta dei limiti, in quanto non è in grado di rilevare e riportare più di una sequenza se nel campione sono presenti più ceppi. La presenza di più di cinque ambiguità in un risultato di sequenziamento Sanger del ORF5 è una potenziale indicazione di più di un ceppo nel campione (16). Inoltre, il sequenziamento di un solo gene non può identificare ciò che accade in altre regioni genomiche. In uno studio con dati longitudinali di 18 allevamenti, è stato riportato che l'ORF5 non era più incline alla diversità rispetto ad altre regioni genomiche (17).

Negli ultimi anni, è stata introdotta una tecnica denominata sequenziamento di nuova generazione (NGS) (15) e i progressi nelle tecniche epidemiologiche hanno fatto sì che i risultati NGS avessero un valore per l'indagine epidemiologica del PRRSV. Come i test PCR real time che prevedono il rilevamento di un analita e una soglia di ciclo di rilevamento, la NGS prevede il rilevamento di un agente e del corrispondente genoma intero o di frammenti di genoma, denominati contigs. Il confronto dei genomi interi del PRRSV con database pubblici o privati è essenziale per determinare se una sequenza specifica è stata già identificata in precedenza. Se i metadati sono disponibili, questo confronto può fornire ulteriori informazioni su quando e dove la sequenza è stata identificata. Tuttavia, il confronto di una determinata sequenza con una banca dati non è spesso fruibile agli allevament/sistemi produttivi per il loro processo decisionale, a causa della scarsità di un contesto epidemiologico e clinico pertinente, che è raramente disponibile al pubblico.

Il quesito epidemiologico di PRRSV deve nascere da scenari specifici dell'azienda o del sistema di produzione; è quindi importante mettere a disposizione per il confronto un ceppo di PRRSV di riferimento dell'azienda o della filiera produttiva.

Un approccio ragionevole è quello di raccogliere campioni in un focolaio di PRRS, fare l'NGS per rilevare l'intera sequenza genomica, e considerarla come ceppo di riferimento. In alternatia, possono essere conservati ceppi PCR-positivi con basso Ct per successive analisi NGS. La necessità di ricorrere all'NGS dipenderà poi dal quesito epidemiologico da affrontare.
L'uso di NGS aiuta a identificare se:
- si è verificata nel tepo un'evoluzione genetica di una sequenza
- nel campione sono presenti ceppi wild-type sottostanti,
- si sono verificate mutazioni o eventi di ricombinazione al di fuori dei geni ORF5 o ORF7 (18).

L'NGS diventa utile per gli allevamenti da riproduzione che progrediscono verso la negatività o il controllo del PRRSV, ad esempio, quando diminuiscono i segni clinici o i valori di Ct nel campionamento di monitoraggio. Se il quesito è **verificare se una data sequenza si è evoluta nel tempo**, l'esecuzione di NGS su singoli tipi di campioni come siero o polmone con Cts a 20 è più utile per recuperare un genoma di PRRSV intero (18). Il genoma recuperato può essere confrontato con i ceppi di riferimento dell'allevamento per capire se ci sono mutazioni (sostituzioni, delezioni e inserzioni) o eventi di ricombinazione o se è stata identificata in allevamento una nuova sequenza (18). L'inclusione di sequenze di vaccini a virus vivi modificati (MLV) nel confronto fornisce ulteriori informazioni se si è verificato un evento di ricombinazione wild-type e vaccinale (18).

Se la domanda è **capire se più di un ceppo di PRRSV circoli in un allevamento**, l'esecuzione di NGS in campioni aggregati e basati sulla popolazione, ad esempio processing fluids o fluidi orali può fornire informazioni sulla nube virale presente nel campione. È molto probabile che i campioni di popolazione recuperino i contig e il confronto con un ceppo di riferimento dell'azienda può rivelare la presenza di ceppi aggiuntivi circolanti (17). Se vengono rilevati ceppi aggiuntivi, il confronto con sequenze MLV note può determinare se le sequenze aggiuntive sono ceppi MLV o ceppi wild-type.
Gli allevamenti da riproduzione che ospitavano tre o più ceppi durante il processo di eradicazione, presentavano maggiori perdite totali e impiegavano 12 settimane in più per raggiungere la stabilità rispetto a quelli che contenevano fino a 2 ceppi (17).

Le **ricombinazioni** sono frequentemente osservate in campo e riportate all'interno di PRRSV-1 o PRRSV-2, ma non tra le due specie (17, 19-28). La ricombinazione è un fenomeno continuo. La differenza fondamentale è che al giorno d'oggi, i progressi nelle tecniche diagnostiche, bioinformatiche e negli strumenti epidemiologici rendono più facile la creazione di database dell'intero genoma e l'identificazione di ceppi ricombinanti. Il verificarsi di un evento di ricombinazione richiede la co-infezione da parte di due o più ceppi nello stesso ospite e cellula, accoppiato con la replicazione, come prerequisito per lo scambio di materiale genetico (29).
L'identificazione temporale di un ceppo parentale circolante nella mandria prima del recupero di un ceppo ricombinante fornisce plausibilità biologica per l'evoluzione genetica attraverso un evento di ricombinazione. Gli eventi di ricombinazione possono verificarsi all'interno di sequenze wild-type o vaccine-like o tra le sequenze wild-type e vaccino. Eventi di ricombinazione sono stati associati all'emergere di ceppi di PRRSV-1 molto aggressivi,

ceppo Rosalia in Europa (28, 30), e PRRSV-2, ceppo L1C.5 negli Stati Uniti (precedentemente nota come variante L1C RFLP 1-4-4) (31-33). Gli allevamenti da riproduzione che hanno sperimentato focolai con ceppi ricombinanti hanno avuto un aumento delle perdite di suinetti rispetto a quelli che hanno affrontato focolai senza identificazione di ceppi ricombinanti (17).

I progressi negli strumenti epidemiologici e nell'interpretazione dei risultati NGS hanno fornito informazioni scientifiche per la gestione e il controllo del PRRSV. La creazione di librerie dell'intero genoma di PRRSV basate su un singolo allevamento o filiera produttiva forniscono un mezzo sempre più efficiente per combinare i dati genetici e biologici dei suini nel processo decisionale e nelle strategie di intervento per il controllo del PRRSV.

BIBLIOGRAFIA

1. Kappes MA, Faaberg KS. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. Virology. 2015;479-480:475-86.
2. Zimmerman JJ, Dee SA, Holtkamp DJ, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses (Porcine Arteriviruses). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J, editors. Diseases of Swine. 11 ed: Wiley Blackwell; 2019. p. 685-708.
3. Meulenberg JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology. 1993;192(1):62-72.
4. Terpstra C, Wensvoort G, Pol JM. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. Vet Q. 1991;13(3):131-6.
5. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q. 1991;13(3):121-30.
6. Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J Vet Diagn Invest. 1992;4(2):127-33.
7. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest. 1992;4(2):117-26.
8. Trevisan G, Linhares LCM, Crim B, Dubey P, Schwartz KJ, Burrough ER, et al. Macroepidemiological aspects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection by major United States veterinary diagnostic laboratories over time, age group, and specimen. PLoS One. 2019;14(10):e0223544.
9. Wesley RD, Mengeling WL, Lager KM, Clouser DF, Landgraf JG, Frey ML. Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. J Vet Diagn Invest. 1998;10(2):140-4.
10. Yim-Im W, Anderson TK, Paploski IAD, VanderWaal K, Gauger P, Krueger K, et al. Refining PRRSV-2 genetic classification based on global ORF5 sequences and investigation of their geographic distributions and temporal changes. Microbiol Spectr. 2023;11(6):e0291623.
11. Paploski IAD, Pamornchainavakul N, Makau DN, Rovira A, Corzo CA, Schroeder DC, et al. Phylogenetic Structure and Sequential Dominance of Sub-Lineages of PRRSV Type-2 Lineage 1 in the United States. Vaccines (Basel). 2021;9(6).

12. Paploski IAD, Corzo C, Rovira A, Murtaugh MP, Sanhueza JM, Vilalta C, et al. Temporal Dynamics of Co-circulating Lineages of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Front Microbiol. 2019;10:2486.
13. Shi M, Lam TT, Hon CC, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RK, et al. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J Virol. 2010;84(17):8700-11.
14. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5463-7.
15. Zhang J, Zheng Y, Xia XQ, Chen Q, Bade SA, Yoon KJ, et al. High-throughput whole genome sequencing of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus from cell culture materials and clinical specimens using next-generation sequencing technology. J Vet Diagn Invest. 2017;29(1):41-50.
16. Gauger P, Harmon K, Trevisan G, editors. Review of tools to discriminate between wild-type and vaccine-like strains of PRRSV. 54th Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians; 2023; Denver: AASV Pre-Conference Seminars 2023 Be there! PRRSV Monitoring and Diagnostics.
17. Trevisan G, Zeller M, Li G, Zhang J, Gauger P, Linhares DCL. Implementing a user-friendly format to analyze PRRSV next-generation sequencing results and associating breeding herd production performance with number of PRRSV strains and recombination events. Transbound Emerg Dis. 2022.
18. Trevisan G, Zeller M, Li G, Zhang J, Gauger P, Linhares D, editors. Cracking the whole genome sequencing code: How to visualize and make sense of results. 54th Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians; 2023; Denver: AASV Pre-Conference Seminars 2023 Be there! PRRSV Monitoring and Diagnostics.
19. Lalonde C, Provost C, Gagnon CA. Whole-Genome Sequencing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus from Field Clinical Samples Improves the Genomic Surveillance of the Virus. J Clin Microbiol. 2020;58(11).
20. Risser J, Ackerman M, Evelsizer R, Wu S, Kwon B, Hammer JM. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic variability a management and diagnostic dilemma. Virol J. 2021;18(1):206.
21. Trevisan G, Magstadt D, Woods A, Sparks J, Zeller M, Li G, et al. A recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 field strain derived from two PRRSV-2-modified live virus vaccines. Frontiers in Veterinary Science. 2023;10.
22. Wang A, Chen Q, Wang L, Madson D, Harmon K, Gauger P, et al. Recombination between Vaccine and Field Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Emerg Infect Dis. 2019;25(12):2335-7.
23. Shi M, Lemey P, Singh Brar M, Suchard MA, Murtaugh MP, Carman S, et al. The spread of type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in North America: a phylogeographic approach. Virology. 2013;447(1-2):146-54.
24. Rawal G, Krueger KM, Yim-Im W, Li G, Gauger PC, Almeida MN, et al. Development, Evaluation, and Clinical Application of PRRSV-2 Vaccine-like Real-Time RT-PCR Assays. Viruses. 2023;15(11).
25. Kvisgaard LK, Kristensen CS, Ryt-Hansen P, Pedersen K, Stadejek T, Trebbien R, et al. A recombination between two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs. Transbound Emerg Dis. 2020.
26. Eclercy J, Renson P, Lebret A, Hirchaud E, Normand V, Andraud M, et al. A Field Recombinant Strain Derived from Two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) Modified Live Vaccines Shows Increased Viremia and Transmission in SPF Pigs. Viruses. 2019;11(3):296.

27. Renson P, Touzain F, Lebret A, Le Dimna M, Quenault H, Normand V, et al. Complete Genome Sequence of a Recombinant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain from Two Genotype 1 Modified Live Virus Vaccine Strains. Genome Announc. 2017;5(22).
28. Martín-Valls GE, Cortey M, Allepuz A, Illas F, Tello M, Mateu E. Description of a New Clade within Subtype 1 of Betaarterivirus suid 1 Causing Severe Outbreaks in Spain. Microbiol Resour Announc. 2022;11(7):e0030422.
29. Mötz M, Stadler J, Kreutzmann H, Ladinig A, Lamp B, Auer A, et al. A Conserved Stem-Loop Structure within ORF5 Is a Frequent Recombination Hotspot for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) with a Particular Modified Live Virus (MLV) Strain. Viruses. 2023;15(1).
30. Martín-Valls GE, Cortey M, Allepuz A, Illas F, Tello M, Mateu E. Introduction of a PRRSV-1 strain of increased virulence in a pig production structure in Spain: virus evolution and impact on production. Porcine Health Manag. 2023;9(1):1.
31. Trevisan G, Li G, Moura CAA, Coleman K, Thomas P, Zhang J, et al. Complete Coding Genome Sequence of a Novel Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 2 Restriction Fragment Length Polymorphism 1-4-4 Lineage 1C Variant Identified in Iowa, USA. Microbiol Resour Announc. 2021;10(21):e0044821.
32. Rawal G, Almeida MN, Gauger PC, Zimmerman JJ, Ye F, Rademacher CJ, et al. In Vivo and In Vitro Characterization of the Recently Emergent PRRSV 1-4-4 L1C Variant (L1C.5) in Comparison with Other PRRSV-2 Lineage 1 Isolates. Viruses. 2023;15(11).
33. Kikuti M, Paploski IAD, Pamornchainavakul N, Picasso-Risso C, Schwartz M, Yeske P, et al. Emergence of a New Lineage 1C Variant of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 2 in the United States. Front Vet Sci. 2021;8:752938.

PESTE SUINA AFRICANA IN LOMBARDIA: FATTORI DI RISCHIO E MODALITÀ DI DIFFUSIONE NEL SUINO

BELLINI S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna (IZSLER)

A giugno 2023, in provincia di Pavia sono stati individuati due casi di peste suina africana (PSA) nel cinghiale. Questi primi 2 casi si sono verificati in un'area già in zona di restrizione PSA a causa della contiguità geografica con il Piemonte, dove la malattia stava circolando da gennaio 2022. Il 18 agosto 2023, sempre in provincia di Pavia, è stato confermato il primo focolaio di PSA in un allevamento di suini a Montebello della Battaglia, in un'area della provincia di Pavia a sud del Fiume Po. Questo focolaio si è verificato in un'area già considerata a rischio di introduzione PSA in un'area dove proprio per evitare il passaggio dell'infezione ai suini domestici, erano già stati inviati alla macellazione tutti i suini degli allevamenti familiari. Il focolaio di Montebello è stato accertato in un allevamento da ingrasso di piccole dimensioni con forti elementi di rischio legati all'esposizione ambientale. Per questo focolaio sono stati effettuati i controlli previsti dalla legislazione vigente e, dopo questo episodio, in questa area, non ci sono state più evidenze della presenza dell'infezione nei suini.

Il 24 di agosto 2023 un secondo focolaio è stato identificato nel comune di Zinasco, a nord del Po, in questo caso la malattia è diffusa e sono stati individuati 7 focolai. Per semplicità descrittiva e in mancanza di evidenze di correlazioni, considereremo i primi due focolai che sono localizzati a sud e nord del Fiume Po, come due cluster separati d'infezione: il cluster di Montebello della Battaglia costituito da 1 solo focolaio e il cluster di Zinasco che comprende 8 focolai. In seguito al focolaio a Zinasco, in un'area ristretta di 3,4 Km^2, sono stati confermati 5 focolai, di cui 1 in un allevamento non DPA. Due focolai sono stati invece individuati nei comuni di Dorno (1) e Somma (1), questi focolai erano al confine con l'area infetta, in comuni limitrofi a Zinasco e il più distante dei 2 due focolai dista 6 Km dal primo focolaio di Zinasco. Per questi focolai sono stati individuati diversi fattori di rischio e diverse plausibili modalità di diffusione dell'infezione. L'ultimo focolaio di questo cluster è stato confermato il 27/09/2023 nel comune di Pieve del Cairo, in un allevamento della stessa filiera di 3 dei focolai di Zinasco.

Tutti i focolai, ad eccezione dell'ultimo del cluster di Zinasco, sono stati individuati in allevamenti da ingrasso che effettuano il tutto pieno-tutto vuoto, erano quasi tutti alla fine del ciclo di produzione e in nessuno di questi allevamenti ci sono stati spostamenti di animali da vita, e questo ha aiutato nella gestione dell'epidemia. Un focolaio si è verificato in un allevamento da riproduzione ciclo aperto dove invece erano avvenuti spostamenti di animali da vita. Fortunatamente questo focolaio è stato identificato precocemente, quando la malattia era ancora confinata in 1 capannone (gestazione), distante dal capannone da dove erano usciti gli animali da vita e quindi non ha dato origine a focolai secondari.

Nell'area erano già applicate le misure di controllo previste dalla legislazione vigente in caso di PSA. In seguito all'insorgenza della malattia nei suini sono state adottate ulteriori misure di controllo per scongiurare l'ulteriore diffusione dell'infezione e comprendere la reale espansione dell'epidemia.

Ad oggi, la PSA in Lombardia è rimasta confinata nella provincia di Pavia dove sono stati riportati 9 focolai nei suini domestici e 150 casi nel cinghiale. L'ultimo focolaio nei suini è stato confermato il 27 settembre 2023, la malattia invece continua a circolare nei cinghiali,

rappresentando un costante rischio per i suini domestici. Vista l'espansione territoriale dell'infezione nei cinghiali sono state posti sotto restrizione anche alcuni comuni della provincia di Milano e di Lodi, nel tentativo di evitare l'ulteriore trasmissione dell'infezione verso le aree indenni dove l'elevata densità di suini potrebbe costituire un ulteriore fattore di rischio per la diffusione della PSA.

ESPERIENZA PRATICA NELL'INDIVIDUAZIONE E NELLA GESTIONE DI UN FOCOLAIO DI PESTE SUINA AFRICANA IN UN'AZIENDA COMMERCIALE - IMPLICAZIONI SUL SISTEMA PRODUTTIVO

BALABAN A.

USAMV Bucharest
Romanian Association of swine veterinarians

Durante l'intervento al meeting SIPAS sono state presentate alcune misure pratiche impiegate nell'individuazione e nella gestione di un focolaio di peste suina africana (PSA) all'interno di un allevamento commerciale.
Sono inoltre state esplorate le implicazioni del focolaio sull'intero sistema produttivo, facendo luce sulle sfide affrontate e sulle lezioni apprese durante la crisi. În particolare, sono state approfondite le fasi iniziali dell'individuazione del focolaio, evidenziando l'importanza di una risposta rapida e di strategie di comunicazione efficaci per limitare la diffusione della PSA. Inoltre, sono state illustrate le varie strategie di gestione impiegate, tra cui le misure di quarantena, i protocolli di abbattimento e i miglioramenti della biosicurezza, con particolare attenzione alla loro efficacia nel controllare ed eradicare il virus.
Durante l'intervento sono state evidenziate le implicazioni economiche e operative dell'epidemia di PSA nnegli allevamenti commerciali, esaminando le interruzioni della produzione, le catene di approvvigionamento e le dinamiche di mercato.
Le conoscenze acquisite da questa esperienza pratica contribuiscono a una più ampia comprensione della gestione della PSA, sottolineando la necessità di misure proattive per prevenire e mitigare l'impatto di future epidemie nei sistemi industriali di produzione suinicola.

PESTE SUINA AFRICANA IN EUROPA E IN ITALIA: AGGIORNAMENTI EPIDEMIOLOGICI

ISCARO C.[1], RUOCCO L.[2], DI SABATINO D.[3], SORDILLI M.[2], PACELLI F.[2], PLASMATI F[2], 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 (CEREP), Perugia, ITALIA;
[2]Ministero della Salute, Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari, Ufficio III, Roma, ITALIA;
[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzz≤o e Molise "Giuseppe Caporale", Centro di Referenza Nazionale per l'Epidemiologia Veterinaria, la Programmazione, l'Informazione e l'Analisi del Rischio, Teramo, ITALIA.

INTRODUZIONE

La peste suina africana (PSA) rappresenta la maggiore sfida del settore zootecnico a livello globale. Il virus della PSA causa una malattia di tipo emorragico nei suini selvatici e domestici. Dalla sua culla di origine, rappresentata dall'Africa sub-sahariana, la PSA è stata occasionalmente trasmessa ai suini domestici in Europa nella seconda metà del 1900, probabilmente attraverso l'alimentazione con rifiuti di cucina contaminati. Dopo l'introduzione della PSA in Portogallo e Spagna, si sono verificati altri focolai in diversi paesi in Europa e in Sud America che con difficoltà sono stati eradicati, tranne in Sardegna, dove il virus è rimasto endemico per oltre 40 anni. Una seconda ondata epidemica è iniziata nel 2007, quando il genotipo II del virus è stato introdotto in Georgia. Da lì, la PSA si è rapidamente diffusa in diversi Paesi dell'Europa orientale, colpendo l'Armenia e la Federazione Russa nel 2007 e l'Azerbaigian nel 2008. L'Ucraina e la Bielorussia hanno registrato i primi casi di PSA rispettivamente nel 2012 e nel 2013. La Lituania rappresenta il primo Stato membro dell'Unione Europea ad essere stato infettato nel gennaio 2014, seguita da Polonia, Lettonia ed Estonia, nello stesso anno. Da allora, la PSA si è diffusa in tutta l'Europa orientale, centrale e meridionale, coinvolgendo, tra gli altri, la Repubblica Ceca e la Romania nel 2017, il Belgio, la Bulgaria e l'Ungheria nel 2018 e la Slovacchia nel 2019. Successivamente, è stato segnalato il primo focolaio di PSA nei suini domestici in Grecia e nel 2020 sono stati confermati i primi casi nei cinghiali in Germania. Nel 2022 la PSA è stata notificata in Italia, che ha sperimentato alcuni eventi di traslocazione anche nel 2023. Alcuni stati balcanici (Bosnia-Erzegovina/Croazia) si sono aggiunti alla lista dei paesi infetti nel 2023, così come la Svezia. La Commissione Europea lavora costantemente con l'obiettivo principale di coordinare le azioni degli Stati membri sia per prevenire l'insorgenza della PSA nei territori ancora liberi, sia per controllarla ed eradicarla laddove presente, attraverso un'azione di collegamento con i Paesi terzi e con le organizzazioni internazionali (WOAH, GF-TAD). Inoltre, la Commissione Europea provvede alla sviluppo e all'aggiornamento della legislazione, compresa la gestione del rischio attraverso il criterio della regionalizzazione (1) e la pubblicazione di linee guida con gli orientamenti comunitari sulla prevenzione, sul controllo e sull'eradicazione della PSA (2). Al tempo stesso, la Commissione Europea si è impegnata a supportare gli Stati Membri sia per armonizzare gli sforzi nazionali di formazione e di sensibilizzazione tra i cacciatori, i veterinari, gli agricoltori e il pubblico in generale (3) sia per fornire assistenza scientifica, tecnica, gestionale e pratica, ai fini del controllo e della eradicazione della malattia (4). Per poter aggiornare le politiche di prevenzione, controllo e gestione della malattia, sono necessari approfondimenti sui fattori di rischio legati all'introduzione della PSA in nuovi territori, alla diffusione e alla persistenza della malattia in Europa. EFSA (European Food Safety Authority) rappresenta l'Agenzia

della Unione Europea in grado di fornire consulenza scientifica per assistere i gestori del rischio, come la Commissione europea, nell'assumere decisioni e misure pertinenti (5). L'EFSA fornisce opinioni scientifiche e linee guida sulla gestione del rischio, ed è tenuta ad elaborare aggiornamenti epidemiologici annuali sull'evoluzione della PSA nella UE, collezionando i dati trasmessi dagli Stati membri e provvedendo alla loro standardizzazione e analisi. La più recente relazione epidemiologica annuale sulla situazione della PSA nell'UE è stata pubblicata da EFSA a maggio 2023 (6).

MATERIALI E METODI

Sul website della Unione Europea, una intera sezione è dedicata alla PSA (7), rappresentando la fonte ufficiale dei dati della presente analisi descrittiva per quanto riguarda i paesi dell'Unione. La analisi descrittiva della situazione epidemiologica relativa alla PSA in Italia è invece basata su diverse fonti di dati presenti nei Sistemi informativi del portale VETINFO, che rappresenta il supporto informatico della rete di sorveglianza epidemiologica nazionale (8). In particolare, le attività di sorveglianza passiva nei territori indenni sono rendicontate 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, sin dal primo anno di applicazione del Piano Nazionale di Sorveglianza ed Eradicazione per PSA. Nel 2022, quando il virus della PSA ha fatto il suo ingresso in Italia continentale, è stato necessario implementare i flussi informativi, allo scopo di permettere alle autorità competenti di monitorare i risultati delle attività svolte per il controllo e l'eradicazione della malattia, e applicare misure adeguate a seconda dell'andamento dei dati. Hanno pertanto visto la luce la Dashboard PSA, che visualizza in tempo reale i dati relativi alle attività di sorveglianza ed eradicazione sul territorio nazionale (numero di prelievi e numero di focolai, entrambi suddivisi per domestici e selvatici), sia in formato tabellare che su mappa, e il Bollettino Epidemiologico PSA, che riunisce, in uno strumento agile e di pronta consultazione, le principali informazioni relative alla situazione epidemiologica della malattia, alle attività condotte nelle zone soggette a restrizione e nelle zone indenni, agli approfondimenti attraverso il rimando ai siti delle Istituzioni che, a livello nazionale e comunitario, si occupano di PSA. I piani di eradicazione della PSA nelle regioni coinvolte, come anche ogni caso sospetto nel territorio indenne, sono gestiti attraverso il sistema informativo SIMAN.

RISULTATI

Nel 2023 la malattia risulta presente in quattordici Stati membri: Bulgaria, Croazia, Cechia, Estonia, Germania, Grecia, Ungheria, Italia, Lettonia, Lituania, Polonia, Romania, Slovacchia e Svezia. Inoltre, nel 2023, sia Bosnia-Erzegovina che Croazia hanno notificato la presenza della PSA per la prima volta nelle popolazioni selvatiche e domestiche. L'ultimo paese europeo, in ordine di tempo, ad essere stato coinvolto dall'attuale ondata epidemica è la Svezia, dove la malattia ha fatto la sua comparsa nel cinghiale ad agosto 2023. Ad oggi, il Belgio e la Repubblica Ceca sono gli unici due Paesi europei che hanno vinto la sfida della eradicazione della PSA nei cinghiali. Tuttavia, la PSA è stata reintrodotta nella Repubblica Ceca alla fine del 2022, dopo un periodo di assenza di 4 anni, presumibilmente attraverso cinghiali infetti provenienti da paesi confinanti. Il primo nuovo caso di malattia è stato infatti notificato in un cinghiale rinvenuto morto a pochi km dal confine con la Polonia e, nel corso del 2023, non solo la prima zona infetta si è estesa gradualmente, ma il virus ha anche compiuto un salto, causando una nuova zona infetta a distanza dalla prima, molto probabilmente attraverso il fattore umano. In Grecia, a gennaio 2023 una nuova ondata epidemica ha coinvolto la popolazione selvatica al confine con la Bulgaria e, a distanza di

qualche mese, la malattia è stata notificata anche nella popolazione domestica, in una area già interessata dalla PSA nel 2020. Attualmente, la situazione epidemiologica del paese rimane dinamica e complicata. In Bosnia-Erzegovina, il primo caso di PSA è stato confermato a giugno 2023 in un allevamento familiare e, a distanza di un mese, la malattia è stata notificata per la prima volta anche nel cinghiale, quando erano già stati confermati più di 130 focolai nel nord-est del Paese. La maggior parte dei focolai è stata riscontrata in piccoli allevamenti non registrati, all'aperto e con un livello di biosicurezza molto basso, tanto che l'ipotesi più probabile di introduzione del virus è il contatto diretto con i cinghiali infetti. A giugno 2023, la malattia ha fatto la sua comparsa anche in Croazia, interessando due allevamenti all'aperto ubicati al confine con la Bosnia-Erzegovina, coinvolgendo rapidamente altri allevamenti, in una zona rivelatasi infetta per il selvatico, dove esiste un corridoio naturale per le popolazioni di cinghiali tra i due paesi. Gli stessi veterinari potrebbero aver contribuito alla diffusione dell'infezione tra gli allevamenti. Ulteriori focolai sono stati confermati nei domestici nella parte orientale del Paese, tanto che a ottobre 2023 più di 1000 allevamenti sono risultati positivi, con un numero elevatissimo di suini in regime di restrizione e una significativa compromissione dell'approvvigionamento dei mercati croati con carne suina. L'infezione è stata notificata anche nel selvatico. Nella Macedonia del Nord la PSA è stata notificata per la prima volta nel 2022, sia nei selvatici che nei suini domestici. Nel 2022 e nel 2023 sono stati notificati numerosi focolai per lo più in allevamenti familiari nella regione nord-orientale e orientale del paese; relativamente alla popolazione selvatica, numerosi casi di positività sono stati riscontrati sia in sorveglianza passiva che attiva. In Svezia, a settembre 2023 è stato confermato il primo caso di PSA nei cinghiali, nell'ambito delle attività di sorveglianza passiva. Gli animali positivi sono stati trovati principalmente vicino a un centro di raccolta dei rifiuti nel comune di Fagersta: per questo motivo, la più probabile via di infezione ipotizzata è rappresentata dal contatto dei cinghiali con materiale contaminato, situato in loco. Tutti i casi sono stati rinvenuti in un'area definita e piuttosto limitata, dove risiede una popolazione di circa 100 cinghiali; inoltre, i pochi suini domestici residenti sono stati abbattuti preventivamente.

In Italia, la malattia continua a diffondersi dal 2022, interessando nuove aree nel 2023 (9). Nel maggio 2023, in provincia di Reggio Calabria il virus è stato rilevato all'interno del Parco Nazionale dell'Aspromonte, dapprima nella popolazione dei cinghiali, successivamente nei domestici; in particolare, nel periodo maggio-luglio 2023, sono stati notificati 6 focolai in allevamenti per lo più di tipo estensivo.
Un'altra nuova introduzione del virus è stata registrata a maggio 2023, in provincia di Salerno, al confine con la Basilicata, nel Parco Nazionale del Cilento/Vallo di Diano e Alburni, coinvolgendo ad oggi solo la popolazione dei selvatici. Qui, a un primo picco di casi, rinvenuti tra maggio e luglio 2023, è seguito un tempo di silenzio epidemiologico, a fronte di attività di ricerca carcasse efficace sul versante campano; a gennaio 2024, una nuova carcassa positiva è stata rinvenuta nel core della zona infetta.
Analogamente, un nuovo picco epidemico si è verificata a Roma, tra maggio e luglio 2023, quando sono state rinvenute più di 40 carcasse positive; questo cluster era stato notificato a maggio 2022, ma nessun caso era stato rinvenuto dopo settembre, tanto che si era avanzata l'ipotesi di una eradicazione della malattia.
Nell'Italia nord-occidentale, il virus ha continuato a diffondersi in Liguria e Piemonte anche nel 2023, causando molteplici casi positivi nei cinghiali. Dalla zona infetta del Piemonte, l'infezione ha raggiunto la Lombardia, coinvolgendo dapprima la popolazione selvatica (provincia di Pavia, territorio dell'Oltrepò Pavese, giugno 2023) e successivamente quella dei domestici, nella stessa provincia, ad agosto 2023. Tra agosto e settembre 2023, si sono

verificati 9 focolai, alcuni dei quali collegati epidemiologicamente tra loro, mentre da ottobre 2023 in poi, sono state rilevate ulteriori positività nei cinghiali residenti nel Parco del Ticino. A causa della vicinanza con i territori infetti della Lombardia, anche la popolazione selvatica della Emilia Romagna è stata coinvolta nel novembre 2023, quando la PSA è stata notificata per la prima volta in un cinghiale trovato morto nella provincia di Piacenza, mentre a gennaio 2024 l'infezione si è estesa alla provincia di Parma. Correlata ai focolai in Lombardia, la prima incursione del genotipo II è stata rilevata in Sardegna, a settembre 2023, in un piccolo allevamento situato nel comune di Dorgali, in provincia di Nuoro: l'azienda infetta rientrava nella zona I delle restrizioni per il genotipo I del virus. Contestualmente, a ottobre 2023, la Sardegna ha ottenuto il riconoscimento dell'eradicazione da PSA, genotipo I, nel settore selvatico, in tutto il territorio regionale, mediante eliminazione della zona di restrizione II, mentre persistono le zone di restrizione I e III per lo stesso genotipo.

DISCUSSIONE

Oltre al ciclo di trasmissione silvestre della PSA, sostenuto dalla interazione tra suidi africani selvatici e zecche del genere Ornithodoros, la cui distribuzione è, pertanto, limitata al continente africano, altri cicli epidemiologici sono stati descritti in Europa (10). È stato riportato un ciclo antropogenico, in cui i suini domestici assumono il ruolo di serbatoio epidemiologico, con il coinvolgimento delle attività human-mediated per la diffusione del virus: le movimentazioni a carattere commerciale di suini e prodotti suinicoli, la vendita di carne infetta e le tipologie di allevamento familiare e all'aperto sono i principali fattori di rischio in questo sistema. Questo ciclo si è sviluppato nel Caucaso a partire dal 2007 e, successivamente, si è diffuso verso nord, coinvolgendo Federazione Russa, Bielorussia, Ucraina. In Romania sono stati segnalati numerosi focolai nei suini domestici, che hanno interessato prevalentemente, ma non esclusivamente, allevamenti con bassi livelli di biosicurezza. Il passo più recente nell'evoluzione del ciclo biologico del virus e della sua diffusione geografica è legato alla formazione del cosiddetto ciclo cinghiale-habitat, sviluppatosi nell'Europa settentrionale e orientale, a partire dal 2014, negli Stati baltici, in Polonia e in Repubblica Ceca, seguiti da Ungheria, Romania e Belgio. Questo ciclo, che è caratterizzato dalla presenza continua del virus nelle popolazioni di cinghiali colpite, continua ad espandere costantemente il suo areale in Europa, facilitato dall'eccezionale stabilità e resistenza del virus nell'ambiente e nelle carcasse degli animali infetti. In Paesi come Bulgaria, Germania e Slovacchia, il ciclo cinghiale-habitat è il principale motore della diffusione e della persistenza della PSA, che porta a un gran numero di casi nei cinghiali e a focolai sporadici nei suini domestici. Nei Balcani sono state identificate diverse sfide sistematiche, come la registrazione degli stabilimenti suinicoli, l'identificazione e la tracciabilità dei suini, che comportano gravi carenze nei controlli dei movimenti; lo scarso controllo dei servizi veterinari sulle percentuali di mortalità nei suini domestici; la applicazione di un sistema di sorveglianza attiva, che ritarda *l'early detection*; la mancata categorizzazione del rischio PSA, sulla base della tipologia di allevamento; un livello di biosicurezza non adeguato, soprattutto negli allevamenti a carattere non commerciale; la oggettiva difficoltà della ricerca attiva delle carcasse in un territorio vasto e montuoso; una scarsa convinzione dei cacciatori, sia nell'applicazione della sorveglianza passiva sia nel rispetto delle misure di biosicurezza prescritte nei territori infetti; la carenza di consapevolezza a livello di tutti gli stakeholder coinvolti. Tutto questo mette a rischio l'applicazione efficiente ed efficace delle misure di prevenzione e controllo della malattia da parte delle autorità competenti ed è una delle ragioni principali del peggioramento della situazione della PSA in questa parte di Europa. Al contrario, in Svezia la strategia di eradicazione ha portato a favorevoli risultati, tanto che tutti i capi positivi sono stati rinvenuti nella area core della zona di restrizione, senza segni di diffusione del virus al di fuori di essa.

In Italia, attualmente la situazione epidemiologica relativa alla PSA appare quanto meno complessa. Di fatto, ad oggi esistono 4 diversi cluster di infezione (Nord-Ovest, Lazio-Roma, Campania-Basilicata, Calabria) che presentano scenari diversi e, al tempo stesso, condividono alcune criticità. Il cluster che appare più compromesso è quello del Nord-Ovest, che continua la sua espansione nella popolazione del selvatico, principalmente verso due direzioni (Toscana ed Emilia Romagna). Di fatto, questa dinamicità, unita alla difficoltà di definire con esattezza e senza ritardo la zona di effettiva circolazione virale nel cinghiale, causa un costante e frequente allargamento delle zone di restrizione.
La presenza della malattia nel selvatico in un territorio esita inevitabilmente nel coinvolgimento del comparto domestico, come di fatto avvenuto negli ultimi mesi in Lombardia. La conseguenza immediata è una gestione complessa degli allevamenti, così come previsto dalle disposizioni normative, oltre alla programmazione ed esecuzione di tutte le attività di controllo della malattia previste anche nella popolazione del selvatico; le conseguenze a medio-lungo termine sono, se possibile, ancora più gravose, con blocchi commerciali che possono protrarsi a lungo nel tempo ed essere sempre più stringenti.
Nel Lazio, la strategia di eradicazione attuata sin da subito ha permesso di ottenere buoni risultati, sebbene la circolazione virale non possa essere definita estinta, come dimostra l'evenienza di una seconda ondata epidemica nella primavera-estate 2023. Le attività messe in atto dalle autorità competenti (contenimento della popolazione dei cinghiali all'interno della area infetta, ricerca attiva delle carcasse e loro rimozione, gestione appropriata dei rifiuti urbani) vengono mantenute nonostante alcune criticità oggettive, come l'impossibilità di impedire i movimenti di cinghiali attraverso alcuni varchi, di fatto non chiudibili, che consentono ai cinghiali di attraversare il Grande Raccordo Anulare.
Anche in Campania, la recrudescenza registrata a gennaio 2024 dimostra come sia necessario mantenere sul lungo periodo e, addirittura, rendere sempre più incisive le attività di sorveglianza passiva rafforzata; d'altra parte, il territorio di questo cluster versa in una situazione sfavorevole anche a causa di una incapacità ad applicare una adeguata sorveglianza sul versante lucano.
In Calabria la situazione epidemiologica si è mostrata, sin da subito, particolarmente critica, data la presenza quasi contemporanea della malattia sia nel cinghiale che nel domestico. Oltretutto, i focolai hanno interessato allevamenti di una razza suina autoctona, provocando ripercussioni gravissime sulla produzione di prodotti suinicoli di nicchia. Le zone di restrizione attualmente definite coprono un territorio molto vasto e difficile da gestire, ma le misure attuate sin d'ora si sono dimostrate inefficaci, essendo difficile elaborare una strategia di eradicazione.
In tutti i cluster di infezione finora presenti, sono state riscontrate criticità oggettive, come la difficoltà di organizzare e mantenere nel tempo una efficace azione di ricerca attiva delle carcasse a causa, ad esempio, di carenza di risorse, delle caratteristiche oro geografiche delle zone in restrizione ecc., così come la scarsa capacità di applicare misure di contenimento della popolazione dei selvatici all'interno della zona infetta, che è legata anche a criticità amministrative nella gestione delle attività previste. D'altronde, è mancata una strategia coordinata di eradicazione soprattutto nei cluster che coinvolgono più di una regione, e le difficoltà di comunicazione non hanno migliorato il livello di consapevolezza negli stakeholders e nella popolazione in generale, come dimostrato dal fatto che le introduzioni del virus nei nuovi territori infetti sono state causate dal fattore umano. Inoltre, mentre la gestione della malattia nel selvatico è di fatto complessa da attuare, le regioni che hanno sperimentato focolai nei domestici hanno dimostrato una pronta reazione all'evento e una appropriata capacità di controllo della malattia, che di fatto è stata riconosciuta ed eradicata adeguatamente, in tutti i focolai notificati.

CONCLUSIONI

Attualmente il rischio di introduzione della PSA è generalizzato e il significativo impatto della malattia sulla salute e il benessere degli animali, sulle economie regionali o nazionali, sullo sviluppo rurale e sul comportamento sociale e politico, rende indispensabile una risposta globale e coordinata. Non solo la malattia tende a persistere nei territori infetti e anzi a progredire inesorabilmente, ma numerosi eventi di traslocazione si verificano ogni anno, a causa del fattore umano che permette al virus di fare notevoli salti a lunga distanza rispetto al fronte epidemico. In alcuni casi, l'introduzione puntiforme del virus e l'espansione della PSA in aree limitate nelle popolazioni di cinghiali residenti è stata affrontata con successo; in altri, la vastità e la complessità orografica dei territori infetti dei selvatici rende particolarmente sfidante il percorso verso l'eradicazione. Per quanto riguarda i suini domestici, la gestione della malattia negli allevamenti è un punto di forza per molti Stati Membri, mentre rappresenta una sfida impegnativa e complessa per i paesi più economicamente svantaggiati. In Italia, la situazione epidemiologica è quanto mai sfidante e richiede l'impiego di competenze, capacità e risorse adeguate. La biosicurezza dovrebbe essere una pratica consapevole e costante, sia in ambito faunistico-venatorio che in quello zootecnico-suinicolo; la sorveglianza passiva continua dovrebbe essere considerata come lo strumento più efficace sia per la *early detection* sia per il controllo della evoluzione della malattia, e le strategie di controllo della popolazione dei cinghiali dovrebbero essere attentamente definite, per non vanificare gli sforzi di eradicazione.

L'esperienza ha insegnato che la gestione della PSA passa attraverso l'informazione e la formazione correttamente distribuita in ogni ambito, come la preparazione alla emergenza e il tema della biosicurezza, che dovrebbero rappresentare i pilastri dei programmi di prevenzione e controllo della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2023/594/oj
2. https://eur-lex.europa.eu/eli/C/2023/1504/oj
3. https://audiovisual.ec.europa.eu/en/video/I-192783
4. https://food.ec.europa.eu/animals/animal-diseases/veterinary-emergency-team_en
5. https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/african-swine-fever
6. EFSA (European Food Safety Authority), Ståhl K, Boklund A, Podgórski T, Vergne T, Abrahantes JC, Papanikolaou A, Zancanaro G and Mur L, 2023. Scientific report on epidemiological analysis of African swine fever in the European Union during 2022. EFSA Journal 2023; 21(5):8016, 50 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8016
7. https://food.ec.europa.eu/animals/animal-diseases/diseases-and-control-measures/african-swine-fever_en
8. https://www.vetinfo.it/
9. Pavone S, Iscaro C, Dettori A, Feliziani F. African Swine Fever: The State of the Art in Italy. Animals (Basel). 2023 Sep 22;13(19):2998. doi: 10.3390/ani13192998. PMID: 37835604; PMCID: PMC10571570.
10. FAO, OIE and EC. 2019. African swine fever in wild boar ecology and biosecurity. FAO Animal Production and Health Manual No. 22. Rome. https://doi.org/10.4060/CA5987EN

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CLUSTER ITALIANI DI PESTE SUINA AFRICANA (PSA) NELL'ONDATA EPIDEMICA 2022-2023

GIAMMARIOLI M.[1], TORRESI C.[1], BICCHERI R.[1], CAMMÀ C.[2], MARCACCI M.[2], DONDO A.[3], RAZZUOLI E.[3], FUSCO G.[4], CASALINUOVO F.[4], SECONDINI B.[2], SCICLUNA M. T.[5], DE GIUDICI S.[6], MORENO MARTIN A. M.[7], ROSSI E.[1], CASCIARI C.[1], PELA M.[1], ISCARO C.[1] AND FELIZIANI F.[1].

[1]Centro di Referenza Nazionale Pesti Suine (CEREP), Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche "Togo Rosati", Perugia.
[2]Centro di Referenza Nazionale per Sequenze Genomiche di Microrganismi Patogeni: Banca Dati e Analisi di Bioinformatica (GEN-PAT), Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo.
[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta "I. Altara", Torino.
[4]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli e Catanzaro Lido, Catanzaro.
[5]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma.
[6]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Sassari,
[7]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e della Emilia Romagna, Brescia, Italia.

La Peste suina africana (PSA) è considerata una delle più devastanti infezioni dei suini domestici e selvatici. Il virus, ampiamente diffuso anche fuori dal continente africano, ha interessato recentemente oltre 24 paesi diversi, tra cui anche l'Italia peninsulare e la Sardegna. Accanto ai tradizionali metodi epidemiologici, la sorveglianza molecolare e l'analisi filogenetica sono in grado di caratterizzare la dinamica della trasmissione virale, localizzare cluster molecolari e tracciare la circolazione di nuovi sottotipi virali. Quindi, per poter comprendere l'origine dell'introduzione e l'evoluzione molecolare del virus nelle diverse aree di circolazione virale è fondamentale caratterizzare dal punto di vista genetico i diversi stipiti circolanti del virus e verificare mediante studi di filogenesi eventuali correlazioni con stipiti che hanno precedentemente circolato in altre aree geografiche. La caratterizzazione molecolare ci fornisce anche informazioni relative a cambiamenti del virus che possono portare alla identificazione di sottotipi virali che possono avere un'importanza non solo dal punto di vista epidemiologico, ma anche in quello clinico e diagnostico.
Il virus della Peste suina africana, in particolare, come molti virus a DNA di grandi dimensioni, ha un tasso di mutazioni molto basso rispetto ai virus ad RNA. Inoltre è caratterizzato da regioni terminali ipervariabili per la presenza di omopolimeri e di sequenze ripetute ed invertite (ITR), che rendono particolarmente difficoltosa l'esatta caratterizzazione molecolare.
Il sequenziamento genomico completo (*whole genome sequencing* - WGS) è il metodo a più alta risoluzione per avere informazioni precise relative alla sequenza nucleotidica del virus, ma proprio per le caratteristiche molecolari del virus della PSA non sempre è efficace applicare un unico approccio di WGS, rendendo necessario lo sviluppo di una strategia di sequenziamento del genoma integrata, proprio per verificare le regioni più complicate del genoma virale. Tale strategia deve essere poi ulteriormente consolidata dal sequenziamento Sanger di porzioni del genoma definite come marcatori molecolari essenziali per la classificazione del virus nei diversi genotipi e nelle loro varianti. Sebbene, il sequenziamento completo rappresenti infatti, il *"gold standard",* il sequenziamento parziale di più geni con significative variazioni può contribuire, oltre che ad una rapida identificazione dei diversi

genotipi/sub genotipi (*Bastos et al. 2003, Gallardo et al. 2023*), anche alla verifica delle regioni critiche. Nonostante oltre quindici anni di circolazione epidemica del genotipo II, non solo in Europa, il genoma di PSA ha accumulato solo pochissime mutazioni e, solo alcune, interessano geni codificanti proteine (*Gallardo et al. 2014*). Recentemente però sono state descritte numerose varianti di PSA in Germania caratterizzate da diverse mutazioni in regioni codificanti (open reading frame, ORFs) probabilmente associate al *frameshift* nel gene O174L gene/PolX (*Forth et al., 2023*).
L'obiettivo dello studio condotto dal Centro di Referenza Nazionale delle Pesti suine (CEREP) è di trovare una strategia di sequenziamento genomico efficace per caratterizzare degli stipiti di PSA appartenenti a diversi cluster di infezione e di avere informazioni più dettagliate sulle loro correlazioni genetiche. L'utilizzo sinergico di due approcci molecolari, il WGS e l'approccio "*multi-genico*", attraverso il sequenziamento Sanger di markers molecolari informativi, può rivelarsi utile a risolvere le problematiche legate alla complessità genomica del virus al fine di ottenere sequenze genomiche di elevata qualità. A tal fine è stata effettuata una selezione di campioni positivi al virus PSA provenienti da cinghiali rinvenuti morti o abbattuti nell'ambito delle attività di sorveglianza passiva e da eventuali casi sospetti in allevamenti di suini. I campioni con caratteristiche di qualità e quantità di DNA idonee sono stati sottoposti a WGS, ovvero a *next-generation sequencing* (NGS), e sequenziamento Sanger. Il totale dei campioni analizzati che hanno mostrato un esito conforme è stato di 111 campioni positivi provenienti da focolai collezionati durante l'ondata epidemica 2022-2023 in Italia, nei diversi cluster di infezione. In particolare: n.67 campioni appartengono al cluster del Nord Italia, n.29 al cluster della regione Lazio, n.5 al cluster della regione Campania, n.11 al cluster della regione Calabria, e infine n. 3 all'unico focolaio identificato in Sardegna.
Il protocollo NGS prevede, nella maggior parte dei casi, la preparazione di librerie a partire da DNA estratto da campioni positivi con il kit Illumina® DNA Prep, (M) Tagmentation e il successivo arricchimento delle precedenti con il kit myBaits Custom.ASFV Predesigned Community Panel (Arbor Bioscences), delle sonde di ibridazione specifiche disegnate sulle sequenze di riferimento del virus. Le librerie così arricchite sono state sequenziate sulla piattaforma Illumina (NextSeq 2000, NextSeq 500, MiniSeq). Contestualmente gli stessi campioni sono stati analizzati mediante il sequenziamento parziale delle seguenti regioni: Vp72, CVR/IGR/O174L/K145R/ MGF505/ECO2, sulla base dei quali si conoscono ben 24 gruppi genetici all'interno del genotipo II di PSA.
I risultati ottenuti dal sequenziamento completo hanno permesso di clusterizzare tutti i campioni analizzati nel genotipo II, evidenziando un'elevata similarità con le sequenze del genotipo II precedentemente descritte in Europa e in Asia dall'ingresso del virus nel 2007. La ridotta variabilità genetica rappresenta in alcuni casi un limite al *trace-back* dei focolai. Con il sequenziamento dell'intero genoma virale e' stato possibile inoltre identificare delle forme delete e/o troncate all'estremità 5' e 3' del virus, con la perdita di diversi geni la cui funzione nella maggior parte dei casi è ancora sconosciuta. Queste varianti virali del virus sono state identificate nel cluster del Nord Italia nel corso del 2022, e, sebbene stipiti deleti del virus sono stati identificati in altri paesi europei in maniera sporadica, le variazioni non sono sovrapponibili a quelle già descritte. Varianti del virus delete/troncate sono state identificate anche nel cluster della regione Calabria, ma queste presentano modifiche non sovrapponibili a quelle identificate nel Nord Italia. Sono in corso degli studi per verificare le caratteristiche cliniche di questi isolati.
Inoltre, l'analisi dei dati ottenuti dai markers molecolari informativi ha permesso di identificare la presenza di due diverse varianti virali: il gruppo genetico 3 e il gruppo genetico 19. Il primo e stato identificato nel cluster del Nord Italia e caratterizza i focolai analizzati durante tutta l'ondata epidemica 2022-2023. Il gruppo genetico 3 mostra il seguente profilo

molecolare: CVR (I), IGR (II), O174L (I), K145R (I), MGF (I), ECO2 (I). La variante IGR II è la più rappresentata: più del 95% degli stipiti circolanti in Europa appartengono a questa variante ed è stata identificata in Ucraina, Bielorussia, Lituania, Polonia, Latvia, Estonia, Repubblica Ceca, Romania, Moldova, Ungheria, Belgio, Belgio. Lo stesso gruppo genetico è stato identificato nel cluster Campano e nell'unico caso notificato in Sardegna, nel corso del 2023. Nel cluster Lazio è stata invece identificata una variante diversa, identificata come gruppo genetico 19 nel corso del 2022, caratterizzato dal profilo molecolare CVR (I), IGR (II), O174L (I), K145R (I), MGF (I), ECO2 (II) e che corrisponde al secondo gruppo genetico più rappresentato, precedentemente identificato in Romania, Bulgaria, Serbia, Grecia, e Nord Macedonia. Le sequenze ottenute dai campioni raccolti nel cluster laziale nel corso 2023 hanno mostrato una modifica a livello della famiglia multi-genica MFG505, caratterizzata dalla perdita di una *repeat* che determina una combinazione di "*tandem repeats sequences"* diversa da quelle fino ad ora descritte. Sulla base di questi dati si può ipotizzare la presenza nel cluster laziale di un nuovo gruppo genetico, denominato gruppo genetico 25, anche se la classificazione definitiva dovrà tenere conto di studi di comparazione con le sequenze dei focolai del Nord della Macedonia, interessata anch'essa dalla recente introduzione dell'infezione.

L'utilizzo del *WGS* ci ha permesso di avere informazioni complete su tutto il genoma virale e di identificare varianti delete/troncate che diversamente non sarebbe stato possibile identificare nella loro complessità. L'approccio "*multi-genico*" ci ha permesso di confermare regioni particolarmente critiche e di classificare tutti gli isolati fino ad ora analizzati in due gruppi genetici già noti, il gruppo genetico 3 e il gruppo genetico 19, identificati in cluster di infezioni diversi e infine un gruppo genetico 25 ipoteticamente nuovo. E' stato, inoltre, possibile identificare la presenza di mutazioni puntiformi (SNPs) in alcuni isolati. Sulla base dei dati fino ad ora a disposizione è possibile ipotizzare due introduzioni esterne in Italia durante l'ondata epidemica 2022-2023, ma ulteriori studi di *time-scaled* sono in corso per confermare tale ipotesi, anche alla luce di un sempre maggior numero di sequenze disponibili in banca dati.

La caratterizzazione molecolare, seppur con qualche difficoltà dovuta alle caratteristiche genetiche del virus, può fornire un valido aiuto nel monitoraggio della dinamica della circolazione e della trasmissione di PSA, soprattutto come supporto all'indagine epidemiologica tradizionale.

Dal punto di vista di sanità pubblica, un'accurata identificazione della circolazione degli stipiti circolanti e dei cluster molecolari di trasmissione può rivelarsi molto importante per definire l'approccio strategico di controllo dell'infezione.

SFIDE E TENDENZE DELLA SUINICOLTURA A LIVELLO GLOBALE

TER BEEK V.

Pig Progress

Il mondo della produzione suinicola è in continuo movimento. Lo sviluppo è continuo, le influenze provengono da più direzioni e le informazioni vanno e vengono. Quando mi è stato chiesto di identificare le "tendenze" nella produzione suinicola globale, mi sembrava che ci tendenze fossero ovunque. Era necessario partire da una definizione chiara. Forse non è la fonte più scientifica, ma Wikipedia descrive la tendenza come segue: "Una tendenza è una forma di comportamento collettivo in cui un gruppo di persone segue con entusiasmo un impulso per un breve periodo". L'enfasi sull'aspetto del comportamento umano collettivo costituisce la chiave di questa presentazione. Pertanto, temi come "sicurezza alimentare", "crescita della popolazione", "aumento della ricchezza", "sicurezza dei mangimi", "inflazione", "guerra in Ucraina" o "salute degli animali" non sono stati inclusi, ma l'attenzione si concentra piuttosto sul modo in cui gli esseri umani (cioè l'industria suina) scelgono di affrontarli.
La primissima lista, condivisa al ESPHM del 2023, consisteva in 12 tendenze, per il XLIX meeting annuale SIPAS, mi soffermerò più dettagliatamente su sei tendenze. Alcune di esse hanno un profondo impatto sulla futura produzione e sul consumo di suini, altre forniranno ispirazione per adottare un approccio diverso da quello attuale. Alcune tendenze possono essere in contrasto tra loro e nessuna di queste deve essere considerata come un "consiglio" per i produttori. L'elenco è stato costruito in ordine alfabetico, quindi dall'ordine non si può dedurre che una sia più importante dell'altra. Verranno messe in evidenza anche alcune soluzioni di cui si sono occupati Pig Progress e i suoi esperti e collaboratori, riflesso del fatto che alcune tendenze stanno effettivamente tenendo occupati gli esperti dell'industria suina.

1. Anticipare il cambiamento climatico
Si tratta di un argomento piuttosto ampio, ma innegabile, che ogni produttore del mondo dovrà imparare a gestire a proprio vantaggio. Alcuni produttori possono percepire solo un impatto limitato, mentre altri finiscono per sentire già i piedi bagnati o il caldo più di prima. È bene che gli allevatori abbiano un piano pronto su cosa fare per assicurarsi che l'acqua o l'energia continuino ad essere disponibili in abbondanza, se la disponibilità di mangimi e i prezzi dei mangimi aumenteranno – e, al contrario, come diventare più versatili approfittando di ore di sole aggiuntive utilizzando i pannelli solari.
Più impegnativa, tuttavia, è anche la questione se l'agricoltura sia (per una piccola parte) anche responsabile del cambiamento climatico. E se sì, quali soluzioni potrebbe prendere in considerazione l'industria suinicola per ridurre la propria impronta sull'ambiente?

2. Applicazione della tecnologia di precisione
La tecnologia di precisione potrebbe essere la risposta per far sì che ogni maiale sia all'altezza del suo potenziale. Non fornire più assistenza per un maiale medio, ma un'attenzione su misura e specifica per il singolo maiale.
Nel corso degli anni sono state sviluppate soluzioni che sono gradualmente cresciute in complessità. Ovviamente esistono soluzioni in grado di registrare automaticamente il completamento di determinate attività, si pensi ad esempio ai dispositivi di vaccinazione automatica. Più complessa è una soluzione in cui sia il compito che il suo completamento possono essere eseguiti automaticamente, ad esempio tutti i tipi di tecnologia di alimentazione.

Gli allevatori possono vedere immediatamente quanto mangime è stato fornito a quale box in quale momento.
Quando anche il rilevamento della necessità di un determinato compito è automatizzato, allora questo è un esempio di zootecnia di precisione (PLF), si pensi ad esempio al rilevamento automatico della tosse (captare i suoni della tosse, dare l'allarme, registrare l'allarme), o alle stazioni di alimentazione di nuova generazione per gli animali all'ingrasso (registrazione dell'arrivo del maiale, rilascio di una razione specifica per il maiale, registrazione di questa azione). Spesso, la PLF viene fornita con il riconoscimento individuale dell'animale. Per questo, sono disponibili varie opzioni, anche se la maggior parte deve essere ulteriormente sviluppata.

3. Migliorare la biosicurezza

Negli ultimi anni, PED, PRRS e PSA hanno chiarito che la biosicurezza può determinare il successo di un allevamento. Prendendo come esempio il virus della PSA, è chiaro che la biosicurezza è la migliore linea di difesa, anche se i vaccini sono in fase di sviluppo. Ad esempio, per una moltitudine di ragioni diverse, la trasparenza e la cooperazione tanto necessarie nella lotta contro il virus non sono sempre presenti, il che porta il virus a diffondersi più rapidamente di quanto sarebbe necessario. Inoltre, a volte non si sa dove si trovi il virus – e il fatto che almeno altri quattro genotipi meno conosciuti siano presenti in Africa, significa che c'è ancora un grosso gap nella conoscenza del virus.
La biosicurezza può essere applicata a livello nazionale e negli allevamenti sia esternamente che internamente.
Il successo della biosicurezza si accompagna alla mentalità, alla consapevolezza e alla trasparenza di coloro che lavorano in azienda. Ci vuole una buona conoscenza e un'ottima comprensione di cos'è il "nemico" e di come si muove. Senza questo, qualsiasi tentativo di migliorare la biosicurezza fallirà.

4. Riduzione delle emissioni

Non solo il benessere animale, ma anche l'ambiente avrà un ruolo sempre più importante nell'allevamento suino del futuro. Gli allevamenti di suini, dopo tutto, hanno un'altra produzione oltre alla carne: le emissioni. Particelle di polvere, odori, ammoniaca, zinco in eccesso, fosforo... Negli ultimi anni, l'elenco è cresciuto, poiché nelle aree densamente popolate le emissioni di azoto sono diventate un problema crescente- negli ultimi anni, i produttori di suini in Belgio e Olanda possono dirci molto al riguardo, poiché le emissioni di azoto sono diventate un problema tanto serio che ha portato a un severo dibattito politico. Forse si può dire: e allora? Questa è solo una situazione in cui la produzione di bestiame coincide con un'alta densità di popolazione e troppe regolamentazioni. Altri diranno: quello che può succedere in una parte del mondo, potrebbe accadere anche in altre paesi. L'esempio dell'Olanda sarà spiegato in modo più dettagliato, compreso ciò che si potrebbe fare al riguardo.

5. Produzione senza antibiotici (e senza ZnO)
Questa tendenza è iniziata circa 20 anni fa nel nord Europa con un tentativo di ridurre l'uso di promotori della crescita antibiotici, in quanto il loro utilizzo avrebbe incoraggiato la resistenza agli antibiotici. A livello globale è cresciuta la consapevolezza che l'uso prudente degli antibiotici è essenziale e, sempre più spesso, anche che l'uso curativo degli antibiotici debba essere applicato con la massima attenzione possibile. Gli sviluppi, tuttavia, sono diversi

da paese a paese. Mentre alcuni ne stanno reprimendo l'uso e hanno modelli trasparenti, in altri paesi gli antibiotici sono ancora liberamente disponibili.
L'impatto maggiore di questa tendenza è stato sicuramente nei suini svezzati, dove l'uso di antibiotici era tradizionalmente il più elevato. Nell'Unione Europea, in Canada e in misura minore in Cina, si è aggiunta alla riduzione dell'uso di antibiotici, la riduzione dei livelli farmacologici di ossido di zinco.
Tutto sommato, i cambiamenti continueranno a portare a un adeguato ripensamento del modo in cui i suini (svezzati) vengono allevati e nutriti.

6. Utilizzo dei social media

Ultimo ma non meno importante, un argomento sottovalutato, ma comunque molto attuale. I social media vengono sempre più utilizzati per condividere le opinioni di qualcuno. Per l'industria suina, i social media costituiscono sia una minaccia che un'opportunità. Una minaccia, perché potrebbero essere fonte di pubblicità negativa per l'industria, ad esempio da parte di attivisti che irrompono e "denunciano" ciò che sta accadendo all'interno degli allevamenti di maiali.
D'altra parte, c'è anche l'opportunità per i produttori di suini e i veterinari di assumere loro stessi questo ruolo e condividere "proattivamente" ciò che sta accadendo negli allevamenti di suini. Ovviamente questo non significa che conquisteranno il cuore di tutti, ma gli allevatori e gli esperti del settore dovrebbero essere disposti a condividere le loro esperienze, il loro modo di lavorare e il loro mondo. Lo scopo non sarebbe quello di fare *cherry picking*, ma piuttosto quello di mostrare in modo trasparente tutto ciò che accade. La conseguenza potrebbe essere quella di far riconsiderare pratiche come la castrazione, il taglio della coda o l'uso di gabbie. Dopotutto, ha ancora senso tenere queste pratiche nascoste, e quindi non poterle spiegare con estrema chiarezza al grande pubblico?
Mettendo insieme tutti i cambiamenti e le tendenze, emerge l'immagine di un'industria e di una società che chiedono di più. L'affluenza e l'urbanizzazione globali in corso continueranno a portare i consumatori più critici ed esigenti a porsi domande. Le tendenze, in un certo senso, sono un inizio per fornire risposte a tutte queste domande, ad esempio:
• Tutti gli antibiotici usati erano davvero necessari?
• Gli animali erano sani?
• Qual è l'effetto della produzione di carne di maiale sull'ambiente?
• Cosa succede esattamente in un allevamento?
• Qual è l'impronta di carbonio della mia fettina di carne di maiale?

LA BIOSICUREZZA UNA PRATICA INDISPENSABILE PER LA SUINICOLTURA SOSTENIBILE

CALEFFI A.

Medico Veterinario L.P.

INTRODUZIONE

Se pensiamo all'assioma che prevenire è meglio che curare, quale migliore pratica al fine di evitare di vedere gli animali ammalarsi possiamo utilizzare, se non quella di impedire che un agente patogeno possa infettare degli individui. Bene a questa pratica abbiamo dato il nome di BIOSICUREZZA, che riassume una lunga lista di azioni in grado di evitare o quantomeno di ridurre il rischio delle infezioni all'interno di una popolazione. Mi fa piacere ricordare quello che si potrebbe con ogni probabilità riconoscere come il precursore di uno dei primi concetti della biosicurezza e mi riferisco al dr. Ignaz Semmelweiz che nel 1847 scoprì l'importanza dell'igiene delle mani al fine di ridurre la mortalità delle puerpere, tenete presente che parliamo di epoca in cui ancora non si conosceva l'esistenza sei batteri!

CONCETTI GENERALI

Come ho affermato nell'introduzione la BIOSICUREZZA si compone di una lunga serie di procedure e protocolli che devono essere attuati e applicati negli allevamenti al fine di ottenere i risultati che ci prefiggiamo. Dobbiamo essere consci che la *biosicurezza assoluta* è una utopia, in quanto i patogeni da affrontare sono innumerevoli e a volte per le loro caratteristiche intrinseche come ad esempio la sopravvivenza ambientale sono molto difficili da combattere e controllare, inoltre l'ambiente allevamento e tutti i passaggi commerciali che questa attività comporta non sono praticamente mai favorevoli ad ottenere la biosicurezza che noi auspichiamo.

La realizzazione di un nuovo allevamento dovrebbe in primis tenere in considerazione alcuni aspetti del territorio come: l'orografia, la presenza di fiumi, laghi, foreste e la densità di quella specie, sia allevata che selvatica. Questo è evidente e logico se non altro per quanto riguarda gli animali della stessa specie potenzialmente promiscui con quelli che andremo ad allevare, mentre per le caratteristiche geografiche esistono studi che dimostrano l'importanza delle barriere naturali al fine di ridurre i rischi da patogeni a diffusione aerogena.

Con il passare del tempo molti concetti sono stati acquisiti e messi in pratica al fine di ottenere allevamenti sempre più biosicuri, ma ancora oggi siamo in difficoltà nel realizzare e mantenere gli allevamenti free da alcuni patogeni che si rivelano essere più abili di noi nel bypassare tutti i provvedimenti e i protocolli che abbiamo pensato e concretizzato per bloccarli. In prima fila dobbiamo mettere quelli che sono i patogeni che hanno una possibile diffusione aerogena o con aerosol, appare evidente che per questi germi si renda necessario la realizzazione di allevamenti dotati di impianti che siano in grado di consentire l'ingresso dell'aria solo dopo che questa sia stata trattata/filtrata con metodi idonei a impedire l'ingresso di questi patogeni in allevamento. Negli allevamenti dotati di questa tipologia di impianti, viene di solito mantenuta una pressione positiva, cioè si tratta di ambienti dove viene mantenuta una pressione più elevata di alcuni Pascal, rispetto a quella esterna al fine di ridurre il rischio di un ingresso naturale di aria che non sia passata per gli impianti di filtrazione. Sicuramente si tratta di allevamenti che hanno un costo di realizzazione più elevato rispetto ad un allevamento convenzionale, e anche dal punto di vista dei costi di manutenzione ed energia sono da ritenersi più onerosi rispetto a strutture non dotate di questi impianti. Bisogna inoltre ricordare che questa tipologia di impianti sono realizzabili esclusivamente

su allevamenti di nuova costruzione che vengono progettati appositamente per funzionare ad aria filtra, mentre non è possibile realizzarli su allevamenti preesistenti.

Come ben sapete da gennaio 2022 nel nostro paese abbiamo la presenza della PSA con ripetuti focolai nel selvatico e purtroppo con contagi che hanno colpito anche il suino allevato, questo ha portato il nostro sistema sanitario ad emettere il Decreto 28 giugno 2022 sui "Requisiti di biosicurezza degli stabilimenti che detengono suini". A tutt'oggi non tutti gli allevamenti si sono adeguati a questo decreto pubblicato sulla G.U il 22/07/2022 e che dava tempo un anno agli allevatori per adeguarsi a quanto previsto dalla nuova normativa. In verità penso che come molte volte succede, anche in questo caso sono stati commessi degli errori nella stesura del decreto, ad esempio già alla descrizione dei requisiti strutturali per gli allevamenti stabulati ad elevata capacità tra le barriere consentite troviamo la dicitura "barriere naturali", questa espressione prima di tutto ha generato confusione tra gli allevatori che dovevano interpretare la norma ed adeguarsi, in secondo luogo se questo decreto doveva dare le indicazioni sulla biosicurezza nei confronti della PSA in particolare per quanto riguarda il rischio selvatici fermare un cinghiale non è sicuramente una cosa semplice e men che meno con una barriera naturale. Molto curioso ai fini dello studio della epidemiologia e della biosicurezza è l'episodio di gennaio 2024, dove a Napoli su degli snack "vegani" di provenienza cinese non solo è stata dimostrata la presenza di carne suina ma è stata riscontrata anche la presenza del virus della PSA!

Ritornando alla biosicurezza come concetto generale appare evidente come il trasporto degli animali e i suoi attori siano uno dei punti critici più complessi da risolvere, se ci pensiamo bene un ingegnere che disegna il progetto di un automezzo per il trasporto animale non può per sua formazione considerare le problematiche legate al lavaggio e disinfezione cosa invece che per noi è di assoluta priorità. Anche le infrastrutture dedicate alle operazioni di lavaggio e disinfezione sono molte volte non progettate adeguatamente perché queste procedure vengano eseguite nel modo più efficace possibile e soprattutto in qualsiasi condizione metereologica. Penso che molti di voi abbiano vissuto il problema della PED una delle patologie che più evidentemente si può collegare al problema della scarsa biosicurezza dei trasporti. Molti altri germi possono entrare in allevamento per colpa di automezzi non correttamente igienizzati sia di tipo batterico che virale, ovviamente i più a probabili sono quelli che diffondono grazie al ciclo di infezione oro/fecale.

Come già è avvenuto nel mondo avicolo, che ha innalzato il livello di biosicurezza per difendersi dal rischio influenza aviare, la stessa cosa si rende necessaria nel mondo dell'allevamento suinicolo che deve affrontare l'emergenza PSA, un innalzamento del livello di biosicurezza ci porterà anche ad un miglioramento del benessere animale e alla riduzione dell'uso del farmaco cosa possibile solo riducendo l'impatto delle malattie. Pertanto la biosicurezza è la "regina" delle pratiche che possiamo utilizzare per mettere i nostri suini in condizione ottimale per l'aspetto welfare e dal problema antibiotico resistenza. Tutte le persone coinvolte nell'allevamento devono acquisire una forma mentis diversa da quella che abbiamo avuto sino ad oggi, perché nessuna recinzione, zona filtro, aria filtrata, o calzatura dedicata potrà mai dimostrare una efficacia reale se le persone coinvolte nella pratica della BIOSICUREZZA non saranno convinte, formate e motivate al fatto che quello che stanno facendo sarà l'unica via perché l'allevamento possa essere ancora una attività sostenibie.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

APPROCCIO INTEGRATO PER LA SELEZIONE DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS SUIS* PER L'ALLESTIMENTO DI VACCINO STABULOGENO E VALUTAZIONE DELLA DINAMICA DELLE POPOLAZIONI CIRCOLANTI IN ALLEVAMENTI COMMERCIALI

INTEGRATED APPROACH FOR THE SELECTION OF STRAINS TO BE USED IN AUTOGENOUS VACCINES AND ASSESSMENT OF *STREPTOCOCCUS SUIS* POPULATIONS DYNAMICS IN COMMERCIAL SWINE FARMS

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

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

Parole chiave: *Streptococcus suis*; genetic characterization; vaccino stabulogeno
Keywords: *Streptococcus suis*; genetic characterization; autogenous vaccine

Riassunto
Streptococcus (S.) suis è uno dei principali patogeni batterici del suino. Il noto problema dell'antimicrobicoresistenza rende necessario ricercare alternative alla somministrazione di antimicrobici e una pratica di prevenzione della streptococcosi suina *è* la vaccinazione con presidi commerciali o stabulogeni.
Con il presente studio si è indagata l'evoluzione delle popolazioni di *S. suis* responsabili di forme cliniche in 2 allevamenti di suini commerciali, anche in seguito alla somministrazione di vaccino stabulogeno.
A tal fine sono stati analizzati ceppi di *S. suis* isolati in aziende in cui (A) non si è mai eseguita vaccinazione e (S) in cui si esegue regolare profilassi vaccinale basata su caratterizzazioni genetiche dei ceppi. Le caratterizzazioni si sono basate su: sierotipo, marker genetici di virulenza e considerazioni su base genetica (PFGE) tra i ceppi che si sono avvicendati nel tempo nella stessa azienda.
Nell'allevamento A (nessuna vaccinazione) i ceppi circolanti si sono mantenuti costanti nel tempo rispetto a pulsotipo e capsulotipo. Invece, nell'allevamento S (vaccinazione con approccio integrato) si è assistito all'introduzione sporadica e/o ricorrente di ceppi geneticamente distinti rispetto a quelli già circolanti e appartenenti a sierotipi diversi.
Tale fenomeno suggerisce un monitoraggio periodico dei ceppi circolanti in azienda per la messa a punto di strategie vaccinali mirate e supportate da un'approfondita caratterizzazione degli isolati.

Abstract
Streptococcus (S.) suis is one of the most important bacterial pathogens in modern pig farming. The well-known problem of antimicrobial resistance makes it necessary to look for alternatives to the administration of antimicrobials to control bacterial diseases. Thus, commercial or autogenous vaccination against swine streptococcosis is a common practice.

The present study investigated the evolution of *S. suis* populations causing disease in 2 commercial pig farms.
For this purpose, *S. suis* strains isolated in farms where vaccination has never been carried out (A) and where sows have been vaccinated regularly (S) were characterized. The laboratory tests aimed at the identification of the serotype, the presence of genetic virulence factors and the study of genetic correlations (PFGE) between the strains that have been isolated over time in the farms.
In Farm A, the circulating strains exhibited a remarkable stability over time, as evidenced by consistent pulsotype and capsulotype characteristics. Conversely, Farm S experienced sporadic and/or recurrent introductions of genetically distinct strains, spanning diverse serotypes compared to the established circulating strains.
This phenomenon suggests a periodic monitoring of the strains circulating in the herd for the development of targeted vaccination strategies and supported by the characterization of the isolates.

INTRODUZIONE

La streptococcosi suina, malattia sostenuta da *Streptococcus* (*S.*) *suis*, rappresenta una delle principali problematiche sanitarie negli allevamenti commerciali. Questa malattia impatta negativamente non solo sulla salute degli animali ma anche sulle loro performance, portando quindi a danni economici e diminuzione della redditività per gli allevatori.
Le difficoltà che si incontrano nel contrastarla sono dovute principalmente al fatto che *S. suis* può colonizzare i primi tratti dell'apparato respiratorio di soggetti portatori (*carrier*) o provocare gravi forme cliniche spesso letali (meningo-encefaliti, endocarditi, setticemia, artriti e morte improvvisa). Inoltre, può agire come batterio opportunista a seguito della compartecipazione di diversi fattori predisponenti, come sovraffollamento o infezioni virali concomitanti (Barrow, 2021). Accanto a quest'aspetto è da considerare la possibile differenza, in termini di virulenza e diffusibilità, dei ceppi coinvolti nella malattia. Tali differenze a livello genotipico possono coinvolgere il polisaccaride capsulare, che determina l'appartenenza al sierotipo, o la presenza di geni associati a virulenza come la proteina rilasciata dalla muramidasi mistica (*mrp*), la sostanza polimerica extracellulare (*efp*) e la suilisina (*sly*) (Fittipaldi *et al.*, 2012).
Il controllo della malattia è solitamente affidato a molecole chemioterapiche che, in virtù delle loro caratteristiche farmacocinetiche/farmacodinamiche e delle molteplici possibili localizzazioni del patogeno nell'ospite, possono avere delle difficoltà a raggiungere il sito target alle concentrazioni e/o per il tempo necessario a sortire un effetto terapeutico.
In seguito al noto problema dell'antimicrobicoresistenza (AMR), e alla strategia "One-Health" che ne consegue, tutti i settori zootecnici stanno ricercando delle alternative alla somministrazione di antimicrobici per contrastare le malattie batteriche. Le strategie per la gestione della streptococcosi in svezzamento sono volte a controllare e prevenire il manifestarsi della malattia limitandone i fattori predisponenti (management) e intervenendo con vaccinazione (immunoprofilassi) commerciale o stabulogena. Questi ultimi sono vaccini inattivati prodotti a partire dal ceppo isolato dal focolaio in cui sarà somministrato. Tale approccio potrebbe risentire della variabilità antigenica dei ceppi circolanti nel singolo allevamento, anche provocata dalla vaccinazione stessa, che, ad oggi, non è nota.
Date le scarse conoscenze sull'antigenicità di *S. suis* (capsulotipo escluso), risulta intuitivo selezionare i ceppi per l'allestimento del vaccino stabulogeno sulla base dell'organo di isolamento, prediligendo isolati da cervello di soggetti con forma neurologica. La presenza di marker genetici di patogenicità (emolisine e proteine di membrana) ed il capsulotipo sono le caratteristiche batteriche maggiormente indagate, utili alla selezione dei ceppi vaccinali. L'appartenenza allo stesso capsulotipo e il medesimo profilo genetico di virulenza, però, non sono sufficienti

per assicurare una copertura vaccinale in quanto non sono note tutte le componenti antigeniche efficaci di *S. suis*. Ad analisi di tipo genetico, infatti, è possibile associare metodiche che, attraverso l'impiego di enzimi di restrizione (PFGE), siano in grado di fornire informazioni di tipo epidemiologico riguardanti la somiglianza tra isolati batterici responsabili di episodi di malattia nello stesso allevamento e tra allevamenti diversi.
Con il presente studio si è indagata l'evoluzione delle popolazioni di *S. suis* responsabili di forme cliniche in due allevamenti di suini commerciali, l'uno in cui non si mai eseguita vaccinazione e l'altro in cui si esegue regolare profilassi, al fine di verificare variazioni a carico dei ceppi circolanti.

MATERIALI E METODI

Selezione delle aziende

Lo studio ha riguardato 2 aziende (A e S) della provincia di Treviso, simili per tipologia e biosicurezza, caratterizzate da ricorrenti episodi di streptococcosi in soggetti svezzati. Entrambe le aziende eseguono regolare profilassi nei confronti di PRRSv con vaccino vivo attenuato.
In tabella 1 vengono riportati i principali dati aziendali, il periodo di vaccinazione, il numero di ceppi analizzati per ogni allevamento ed il consumo in DDDAit/biomassa delle aminopenicilline (classe di farmaci di prima scelta nella terapia della streptococcosi) ricavato dal portale Classyfarm riferiti al 2022 e 2023.

Allev.	N. scrofe	Vaccinazione	N. ceppi (periodo di isolamento)	DDDAit/biomassa aminopenicilline	
				2022	**2023**
A	450 (banda tri-settimanale)	mai eseguita	10 (mar2020 - mar2022)	5.511	28.648
S	900 (banda settimanale)	2019 - in corso	17 (lug 2018 - giu 2022)	4.379	2.336

Tabella 1. Dati aziendali, il periodo di vaccinazione ed i ceppi analizzati per ogni allevamento.
Table 1. Farm data, vaccination period and strains tested for each herd.

L'allevamento S dal 2019 utilizza regolarmente la vaccinazione con ceppo stabulogeno su scrofe e scrofette con 1° dose a 8 settimane dal parto e richiamo a 4 settimane e ad ogni gravidanza 2-4 settimane prima della data presunta del parto. Il periodo di utilizzo, l'identificativo del ceppo ed il relativo sierotipo sono indicati in tabella 2.

Vaccinazione	Intervallo di tempo	id ceppo	sierotipo
1	ottobre 2019-giugno 2021	2825/19	9
2	giugno 2021- maggio 2023	2883/2/19	9
		1955/2/20	7
		2922/2/20	9
3	Maggio 2023 – in corso	1955/1/20	7
		2332/2/20	9
		3834/2/22	NN

Tabella 2. Periodo di utilizzo, numero identificativo e sierotipo degli isolati utilizzati per l'allestimento di vaccino stabulogeno dell'allevamento S. NN: non tipizzabile.
Table 2. Period of use, identification number and serotype of isolates used for the production of autogenous vaccine in farm S. NN: untypeable.

Isolati batterici
Per valutare la variabilità dei ceppi circolanti nelle aziende inclusi nello studio, sono stati caratterizzati geneticamente 10 ceppi dell'allevamento A e 17 dell'allevamento S. Tutti i ceppi sono stati isolati da soggetti conferiti dal 2017 al 2023 presso la Sezione di Treviso nell'ambito della normale attività diagnostica, accompagnati da anamnesi in cui si riferiva una sindrome nervosa. L'isolamento è avvenuto da campioni di cervello di soggetti con lesioni macroscopiche e/o microscopiche riferibili a streptococcosi riscontrate nel corso dell'esame anatomo-patologico. Il materiale biologico è stato seminato su piastre di agar sangue incubate per 24-48 ore a 37° in condizioni di microaerofilia (5% CO_2) e l'identificazione è avvenuta attraverso MALDI TOF MS (Biotyper Microflex LT, Bruker Daltonics).

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

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

RISULTATI
Fattori genetici di virulenza e sierotipizzazione
Tutti gli isolati (10 ceppi) dell'allevamento "A" risultano positivi al gene *gdh* e, ad eccezione di un ceppo del 2021, tutti i ceppi presentano profilo di virulenza *mrp+ efp- sly+*. Il sierotipo maggiormente isolato è il "9" (8 isolati), che ha provocato malattia in tutti gli anni presi in esame. Nel 2022 sierotipi diversi sono stati isolati contemporaneamente da soggetti diversi conviventi. Nell'allevamento "S" due isolati sono risultati negativi al gene *gdh* e il profilo di virulenza prevalente è *mrp+ efp- sly+* (76,4%). Tre ceppi sono risultati capsulotipo "7" ed erano tutti isolati nel 2020, 10 capsulotipo "9" isolati nel 2018, 2019 e 2020 e 4 non tipizzabili con il protocollo applicato, isolati nel 2019, 2021 e 2022.

Pulsed-field gel electophoresis (PFGE)
Analizzando il dendrogramma originato degli isolati dell'allevamento "A" si evidenziano tre cluster: il più numeroso (III_a, 8 ceppi) comprende almeno un isolato per anno e 7 ceppi risultano tra loro cloni. I restanti due cluster (I_a e II_a) sono costituiti da un solo isolato del 2021 e del 2022. I risultati della PFGE hanno raggruppato gli isolati dell'allevamento "S" in 7 cluster. Il maggiormente popolato (I_s) raccoglie 7 di cui 6 tra loro cloni. A parte 3 cluster (III_s e IV_s) rispettivamente con ceppi del 2020 (III_s e VII_s) e del 2019 (IV_s) tra loro clonali, gli altri ceppi del 2020, 2021 e 2022 si sono collocati in singoli cluster.

Approccio integrato per la selezione dei ceppi da includere nel vaccino stabulogeno
I ceppi sono stati selezionati valutando in primis il sierotipo e, all'interno dello stesso sierotipo, quelli portatori di più marker genetici di virulenza e appartenenti a cluster diversi (PFGE). Per la selezione dei ceppi inclusi nella prima vaccinazione dell'allevamento S (V_1) era disponibile solo il sierotipo e il profilo di virulenza e, per tale ragione, non è stato incluso alcun ceppo che poi si è dimostrato appartenere al cluster I_s.

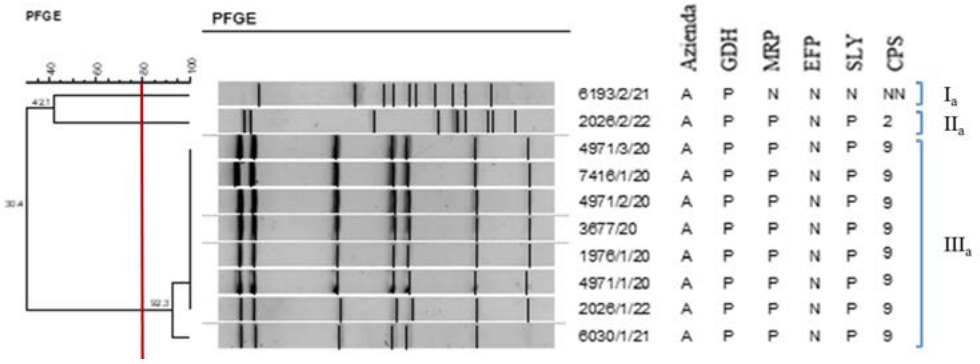


Figura 1. Dendrogramma originato dai pattern PFGE dei ceppi di *S.suis* presenti nell'allevamento A. La linea rossa verticale indica la soglia di omologia dell'80%. P: positivo; N: negativo; NN: non tipizzabile.
Figure 1. Tree diagram showing PFGE patterns of *S. suis* strains isolated in farm A. The red line represents the 80% of homology threshold. P: positive; N: negative; NN: untypeable.

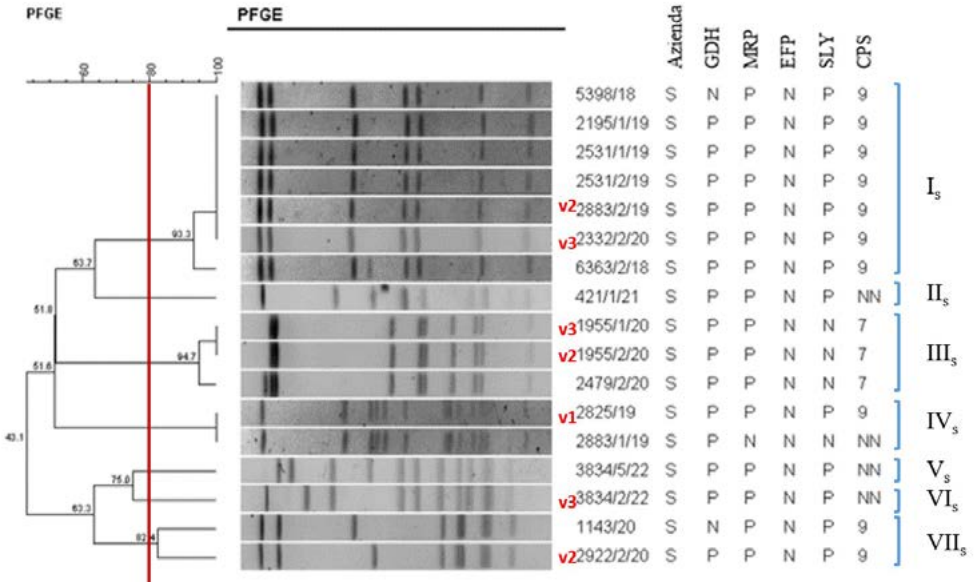


Figura 2. Dendrogramma originato dai pattern PFGE dei ceppi di *S.suis* presenti nell'allevamento S con indicazione dei ceppi utilizzati per l'allestimento di vaccino stabulogeno. La linea rossa verticale indica la soglia di omologia dell'80%. P: positivo; N: negativo; NN: non tipizzabile.
Figure 2. Tree diagram showing PFGE patterns of *S. suis* strains isolated in farm S studied in the present work showing the isolated used to the preparation of autogenous vaccine. The red line represents the 80% of homology threshold. P: positive; N: negative; NN: untypeable.

DISCUSSIONE

Con questo lavoro si è voluto studiare se nello stesso focolaio di malattia siano simultaneamente presenti popolazioni "diverse" di *S. suis* e come queste si avvicendino nel tempo anche successivamente alla somministrazione di vaccini stabulogeni allestiti con i ceppi circolanti in quel dato momento.

Tutti i ceppi inclusi nello studio erano isolati cerebrali, quindi presumibilmente patogeni. Nonostante ciò, i marker genetici di virulenza ricercati, non erano presenti in tutti gli isolati (uno per allevamento) a conferma di quanto evidenziato da altri autori secondo cui la presenza di questi fattori non sia realmente indicativa della capacità del ceppo di provocare malattia (Segura *et al.*, 2020). Questo risultato potrebbe essere dovuto (i) alla necessità di ricercare ulteriori fattori di virulenza ad oggi non noti e/o (ii) a fattori ambientali predisponenti che consentono anche a ceppi meno virulenti di raggiungere il cervello e causare meningo-encefalite.

Negli allevamenti considerati il sierotipo "9" si conferma essere il prevalente, così come descritto da altri autori sia in Italia che in altri paesi dell'Europa occidentale (Goyette-Desjardin *et al.*, 2014; Tonni *et al.*, 2021). Ceppi appartenenti a questo sierotipo e con stesso profilo di virulenza si sono collocati in diversi cluster del dendrogramma dell'allevamento S confermando l'eterogenicità del sierotipo "9", così come descritto da Estrada *et al.*, (2019). La diversa collocazione non implica automaticamente una diversa antigenicità dei ceppi, ma suggerisce l'esito positivo o negativo della vaccinazione nell'impedire l'insorgenza della streptococcosi cerebrale causata dallo stesso clone.

Dai dendrogrammi aziendali si evidenziano due andamenti distinti nelle dinamiche delle popolazioni di *S. suis*. Nell'allevamento S la vaccinazione sembra essere stata in grado di esercitare una pressione selettiva sui ceppi circolanti in azienda, tale da richiedere l'aggiornamento periodico dei ceppi inseriti nel lotto vaccinale: nello specifico, ad eccezione di un ceppo del 2020 clonale con ceppi rilevati in azienda negli anni precedenti, non si sono registrati casi di malattia provocati da *S. suis* con pulsotipo omologo ai ceppi caratterizzati nel 2018 e 2019.

Al contrario, nell'allevamento A isolati con sierotipo, profilo di virulenza e pulsotipo omologo continuano ad essere responsabili di malattia nel corso degli anni formando un ampio cluster. L'assenza di vaccinazione ha comportato l'endemizzazione di un ceppo prevalente, o di ceppi a questo geneticamente strettamente correlati, ritrovato in tutti gli anni considerati. La presenza di questo clone non ha comunque impedito la comparsa di ceppi che si sono resi responsabili di malattia assieme al precedente, differenti sia per sierotipo sia dal punto di vista genetico.

Per quanto riguarda le prescrizioni di aminopenicilline nell'allevamento S il valore in DDD diminuisce dal 2022 al 2023, mentre nell'azienda A si assiste ad un aumento di oltre 5 volte delle prescrizioni di aminopenicilline a indicare una crescente incidenza della patologia in allevamento, lasciando supporre un effetto favorevole della vaccinazione nel contenimento dell'uso dell'antimicrobico.

In generale, i ceppi isolati da soggetti diversi di uno stesso conferimento, risultano appartenere al medesimo cluster, profilo di virulenza e sierotipo, ad eccezione di due episodi (1 per allevamento). Uno stesso focolaio sostenuto da ceppi diversi (sierotipo o pulsotipo), indica la presenza di forte predisposizione alla malattia e suggerisce di concentrare gli sforzi verso la diminuzione di altri fattori predisponenti/condizionanti la malattia (Rieckmann *et al.*, 2020).

Il presente studio ha voluto indagare alcune caratteristiche genetiche dei ceppi circolanti in allevamenti sottoposti o meno a vaccinazione con stabulogeno, senza però valutare quanto la vaccinazione abbia contribuito alla riduzione della problematica. Infatti, i risultati dovrebbero essere comunque messi in relazione a valori di mortalità che, sfortunatamente, non sono disponibili.

CONCLUSIONI

I risultati dimostrano che i marker genetici di virulenza indagati non sono chiaramente correlabili alla reale patogenicità di ceppi che in questo caso hanno raggiunto comunque il cervello. La sola sierotipizzazione non è un elemento sufficiente su cui basare la scelta dei ceppi, in quanto non assicura protezione verso tutti i ceppi appartenenti a questo sierotipo.

Inoltre, si è dimostrato come in alcuni casi ceppi appartenenti a sierotipi diversi o geneticamente distinti possano simultaneamente essere implicati in un focolaio di malattia rendendo difficoltosa la scelta di ceppi utili all'allestimento di vaccini stabulogeni, se queste scelte si basano solo su sierotipo e fattori di virulenza.

La vaccinazione, laddove eseguita, ha esercitato una pressione selettiva sui ceppi precedentemente circolanti. Dato che, oltre al cps, non sono noti determinanti antigenici efficaci nell'evocare una risposta immunitaria adeguata, la selezione di ceppi da inserire nel vaccino stabulogeno sulla base dell'analisi dell'intero genoma (PFGE) potrebbe rivelarsi un valido supporto. Per tale ragione una caratterizzazione degli stessi è imprescindibile per sperare di ottenere dei risultati concreti in assenza di fattori predisponenti critici.

BIBLIOGRAFIA

1. Estrada AA, Gottschalk M, Rossow S, Rendahl A, Gebhart C, Marthaler DG (2019) Serotype and Genotype (Multilocus Sequence Type) of *Streptococcus suis* Isolates from the United States Serve as Predictors of Pathotype. J Clin Microbiol.; 57(9):
2. Fittipaldi N., Segura M., Grenier D., Gottschalk M. (2012). Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. Future Microbiol. 7(2):259-79.
3. Goyette-Desjardins G., Auger J.P., Xu J., Segura M., Gottschalk M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. Emerging Microbes & Infections, 3:1, 1-20.
4. Paul Barrow. (2021) Major pathogens and pathogenesis in Advancements and Technologies in Pig and Poultry Bacterial Disease Control 1a ed. Academic Press
5. Segura M., Aragon V., Brockmeier S.L., Gebhart C., Greeff A., Kerdsin A., O'Dea M.A., Okura M., Saléry M., Schultsz C., Valentin-Weigand P., Weinert LA., Wells J.M., Gottschalk, M. (2020). Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on S. suis. Pathogens 9, no. 5: 374.
6. Tonni M., Formenti N., Guarneri F., Romeo C., Guadagno F., Scali F., Rota Nodari S., Bano L., Bacchin C., Maisano A.M., Vezzoli F., Rosignoli C., Santucci G., Luppi A., Zoppi S., Pasquali P., Alborali G.L. (2021). Caratterizzazione molecolare e profili di antimicrobico-resistenza di ceppi di *Streptococcus suis* isolati in allevamenti del nord Italia nel periodo 2013-2020. In: "Volumi degli atti 2020 e 2021", Verona, XLVI Meeting Annuale SIPAS, 133-143.
7. Vela A. I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M. A., Borge C., Perea J. A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J. F. (2003). Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of clinical microbiology, 41(6), 2498–2502.
8. Silva, L. M., Baums, C. G., Rehm, T., Wisselink, H. J., Goethe, R., & Valentin-Weigand, P. (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. Veterinary microbiology, 115(1-3), 117-127.
9. Rieckmann, K., Pendzialek, S. M., Vahlenkamp, T., & Baums, C. G. (2020). A critical review speculating on the protective efficacies of autogenous Streptococcus suis bacterins as used in Europe. Porcine Health Management, 6(1), 1-11.

MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING, UN VALIDO STRUMENTO PER COMPRENDERE LA DIFFUSIONE DI *MYCOPLASMA HYORHINIS*

MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING, A VALUABLE METHOD TO UNDERSTAND THE SPREADING OF MYCOPLASMA HYORHINIS

NAI G.[1], RIGHETTI V.[1], STEFANI E.[1], GASTALDELLI M.[1], TONDO A.[1], PRATAVIERA D.[1], COLÒ B.[1], ROSSI I.[1], VIO D.[2], MERENDA M.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Verona, Laboratorio di Diagnostica Clinica e Sierologia di Piano, U.O. Micoplasmi, Buttapietra (VR)*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Laboratorio di Patologia e Benessere della Specie Suina, Cordenons (PN)*

Parole chiave: genotipizzazione, *Multi-Locus Sequence Typing*, *Mycoplasma hyorhinis*
Keywords: genotyping, *Multi-Locus Sequence Typing, Mycoplasma hyorhinis*

Riassunto
Mycoplasma hyorhinis (MHR) colonizza il tratto respiratorio superiore del suino e, diffondendo nell'organismo, causa polisierosite, poliartrite, congiuntivite, otite e meningite. MHR è un potenziale agente coinvolto nella *Porcine Respiratory Disease Complex* (PRDC), patologia associata a significative perdite economiche. Ad oggi in Europa non è disponibile un vaccino per MHR, pertanto il controllo dell'infezione è complesso. L'implementazione di metodiche di tipizzazione può rappresentare un fondamentale ausilio per comprendere le dinamiche di diffusione di MHR nella filiera suinicola. In questo lavoro sono stati analizzati 41 ceppi di MHR provenienti da aziende suinicole del Nord Italia. I campioni sono stati tipizzati tramite *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) che, basandosi su un *database* pubblico (PubMLST), consente di identificare i ceppi tramite l'assegnazione di un *Sequence Type* (ST). Il confronto dei campioni isolati con quelli disponibili nel *database* non ha evidenziato correlazioni genetiche legate all'area geografica. L'analisi di ceppi isolati da diverse matrici di prelievo dello stesso evento clinico ha rivelato la mancanza di correlazione tra ST e matrice di prelievo. Infine, è stata osservata correlazione genetica tra i vari ST all'interno della stessa azienda nel tempo. I risultati delle analisi svolte dimostrano che la metodica MLST rappresenta un valido strumento di supporto per comprendere le dinamiche epidemiologiche all'interno delle aziende suinicole.

Abstract
Mycoplasma hyorhinis (MHR) is a common inhabitant of the upper respiratory tract of swine and can cause polyserositis, polyarthritis, conjunctivitis, otitis, and meningitis. In addition, MHR is considered a potential agent involved in the *Porcine Respiratory Disease Complex* (PRDC), a disease associated with relevant economical losses. To date, a vaccine for MHR is not available in Europe, so infection control is complex. Therefore, it is essential to implement typing methods to effectively track MHR spread in the swine sector. In this work, 41 strains of MHR from pig farms in the Northern of Italy were analysed. Each strain was genotyped by *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) and assigned to a specific *Sequence Type* (ST) via direct comparison with a public database (PubMLST). No correlation was found among samples of close geographic origin. The analysis of strains

isolated from different matrices of the same clinical event reveals the lack of correlation between STs and the sampling source. Finally, a consistent genetic relation over time between different STs isolated in the same farm was observed. In conclusion, our results suggest that MLST is a valuable tool to understand the epidemiological dynamics of MHR in the swine sector.

INTRODUZIONE

Mycoplasma hyorhinis (MHR) è un batterio comunemente presente nel tratto respiratorio superiore del suino che possiede la capacità di diffondere in modo setticemico e causare principalmente polisierositi e poliartriti nei suinetti svezzati dalle tre alle dieci settimane di età. MHR è inoltre stato descritto come causa di congiuntivite, otite e meningite (Palzer *et al*., 2020). Il ruolo di MHR come causa primaria di malattia respiratoria è ancora dibattuto; alcuni autori (Lee *et al.*, 2016) includono MHR tra i patogeni coinvolti nella *Porcine Respiratory Disease Complex* (PRDC), evidenziando la sua capacità di concorrere al peggioramento della sintomatologia clinica. La colonizzazione delle prime vie respiratorie da parte di MHR può avvenire precocemente da scrofa a suinetto, o da suino a suino in soggetti adulti, attraverso contatto diretto o secrezioni nasali e fluidi orali. Attualmente non è disponibile in Europa un vaccino commerciale nei confronti di MHR, pertanto il controllo dell'infezione causata da questo agente risulta di non facile implementazione: il contenimento delle forme clinico-sintomatiche è attualmente affidato alle misure di biosicurezza aziendale, all'eventuale trattamento antibiotico degli animali colpiti (Klein *et al.*, 2022) e, non da ultimo, alla possibilità di utilizzo di vaccini stabulogeni prodotti con il ceppo circolante in azienda.

Nel contesto sopra descritto lo studio delle dinamiche di diffusione intraziendale e tra allevamenti diversi riveste un ruolo fondamentale per comprendere come implementare le strategie di controllo di MHR nella filiera suinicola. La genotipizzazione è uno strumento ampiamente utilizzato per studiare l'epidemiologia dei micoplasmi del settore avicolo e per valutare la diffusione di determinati ceppi nella filiera (Matucci *et al*., 2020). Gli strumenti attualmente a disposizione per genotipizzare MHR sono: MLVA (*Multiple-Locus Variable-tandem repeats Analysis*), MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*), cgMLST (*core genome MLST*) e PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). La metodica MLST prevede la selezione di un set di geni costitutivamente espressi in un determinato microrganismo (geni *housekeeping)* che vengono amplificati e successivamente sequenziati al fine di ottenere un profilo allelico che identifica uno specifico *Sequence Type* (ST). Nel corso degli ultimi anni sono stati sviluppati diversi protocolli MLST: Tocqueville *et al*. (2014) e successivamente Trüeb *et al.* (2016) hanno basato la metodica sul sequenziamento di 6 geni *housekeeping* (*dnaA*, *rpoB*, *gyrB*, *gltX*, *adk* e *gmk*); Clavijo *et al*. (2019) hanno utilizzato 2 geni che codificano per proteine di superficie (*p95*, *mtlD*) e 2 geni *housekeeping* (*pdhB*, *ung*) e Földi *et al*. (2020) hanno sequenziato 6 geni *housekeeping* diversi dai protocolli precedentemente citati (*lepA, rpoB, rpoC, gltX, uvrA, valS*). Tra tutte le metodiche MLST elencate, il protocollo di Tocqueville e Trüeb, utilizzato nel presente studio, ha il vantaggio di consentire l'identificazione univoca dei ceppi di MHR tramite il *database* pubblico mondiale PubMLST (https://pubmlst.org/). Tale *database* consente di assegnare a ciascun ceppo un ST basato sul profilo allelico dei 6 geni *housekeeping* amplificati e sequenziati. Lo scopo del presente studio è stato di verificare eventuali differenze tra ceppi di MHR isolati presso l'U.O. Micoplasmi della Sezione di Verona dal 2014 al 2023 e porre le basi per una valutazione epidemiologica delle infezioni da MHR tramite l'utilizzo della metodica MLST.

MATERIALI E METODI

Selezione dei campioni
Sono stati analizzati 41 ceppi di MHR (**Tabella 1**) provenienti da 13 aziende suinicole del Nord Italia: 6 aziende da riproduzione a ciclo chiuso, 2 aziende da riproduzione a ciclo aperto e 5 siti svezzamento. Tali ceppi sono stati isolati tra il 2014 e il 2023 a partire da differenti matrici organiche: polmone (16), articolazione (10), pericardio (5), tampone nasale (5), tampone oculare (2), cervello (2) e peritoneo (1). Per 10 aziende (azienda A, B, D, E, F, G, H, J, K e L) erano disponibili ceppi isolati da matrici differenti provenienti dallo stesso evento clinico ("caso diagnostico") (**Tabella 2**) mentre per 4 aziende da riproduzione a ciclo chiuso (azienda A, H, I e M) erano disponibili diversi ceppi isolati nel corso degli anni (**Tabella 3**).

Isolamento e identificazione
I campioni sono stati inoculati in terreni selettivi *home-made* (*Friis Broth*) e commerciali (*Mycoplasma Experience*), sia in forma liquida che agarizzata, e incubati a 37°C ±1 in microaerofilia (5% CO_2) fino a rilevazione del viraggio di colore del terreno liquido e/o della presenza di tipiche colonie "*fried egg*" al microscopio ottico rovesciato. Successivamente, si è proceduto con l'estrazione del DNA da terreno liquido tramite il kit Maxwel 16 Blood Purification System seguendo le istruzioni suggerite dal produttore. L'identificazione è stata effettuata tramite la metodica 16s-PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (WOAH, 2023).
MLST (Multi-Locus Sequence Typing)

L'analisi è stata eseguita seguendo lo schema implementato da Tocqueville *et al.* (2014) presente in PubMLST che prevede l'amplificazione dei seguenti geni *housekeeping*: proteina di iniziazione della replicazione cromosomica (*dnaA*), subunità β dell'RNA polimerasi (*rpoB*), subunità β della DNA girasi (*gyrB*), glutamil-tRNA sintetasi (*gltX*), adenilato ciclasi (*adk*) e la guanilato chinasi (*gmk*). I *primer* utilizzati sono quelli descritti da Trüeb *et al.* (2016). L'analisi è stata eseguita con il kit qPCR Sybr Fast Universal (ditta Merck) utilizzando lo strumento CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System. Il protocollo di amplificazione prevede uno step inziale a 95°C per 3' seguito da 35 cicli a 95°C per 30'', 55°C per 30'' e 72°C per 45''.

Sequenziamento
Gli amplificati ottenuti sono stati sequenziati per i geni di interesse utilizzando il kit BrilliantDye Terminator Cycle Sequencing (*Resnova*) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer (*Applied Byosystems*). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati tramite il software BioEdit Sequence Aligment Editor V7.2.6.1.
Analisi delle sequenze
Le sequenze ottenute sono state analizzate tramite il *database* pubblico PubMLST. Il *database* assegna ad ogni sequenza depositata un numero corrispondente all'allele per ogni singolo gene dello schema. La combinazione di tutti e 6 i numeri crea un profilo allelico corrispondente ad un determinato ST. Le sequenze alleliche e i ST non presenti nel *database* sono stati codificati e quindi depositati. La correlazione tra i differenti ceppi è stata valutata generando un *Minimum Spanning Tree* (MST) tramite il software Bionumerics v.7.6. Per la definizione di *clonal complex* è stato inserito un *cut-off* di 2 differenze alleliche.

RISULTATI
Tutti i DNA dei ceppi selezionati sono stati amplificati e sequenziati con successo. Attraverso il *database* PubMLST è stato possibile classificare gli isolati in 15 differenti ST di cui 12 sono risultati essere nuovi ST, cioè il risultato di una nuova codifica (da ST 168 a ST 179) (**Tabella**

1). Inizialmente è stato costruito un MST per evidenziare eventuali correlazioni tra i campioni oggetto di studio e i ceppi già depositati in PubMLST provenienti da altri 10 Paesi (**Figura 1**). Come si può notare, i diversi ST vengono suddivisi in 2 *clonal complex* (CC), di cui il CC1 racchiude quasi tutti i ceppi attualmente tipizzati inclusi quelli italiani, mentre il CC2 *è formato unicamente* da n. 2 ST di differente provenienza (Francia e Cina).

ID	AZIENDA	ANNO	MATRICE	ST	Profilo Allelico					
					dnaA	rpoB	gyrB	gltX	adk	gmk
1	Azienda A - RIPR. CC	2017, Oct	lung	174*	3	1	2	1	16*	16*
2	Azienda A - RIPR. CC	2017, Oct	joint	174*	3	1	2	1	16*	16*
3	Azienda A - RIPR. CC	2020, Apr	lung	177*	3	1	2	1	16*	4
4	Azienda A - RIPR. CC	2020, May	lung	174*	3	1	2	1	16*	16*
5	Azienda A - RIPR. CC	2021, Jan	lung	174*	3	1	2	1	16*	16*
6	Azienda B - RIPR. CC	2022, Mar	lung	169*	10	1	2	20*	1	4
7	Azienda B - RIPR. CC	2022, Mar	pericardium	172*	10	1	4	20*	1	4
8	Azienda C - RIPR. CC	2017, Sep	nasal swab	175*	8	1	4	12	1	1
9	Azienda D - RIPR. CA	2015, Jan	nasal swab	40	1	1	2	1	1	3
10	Azienda D - RIPR. CA	2015, Jan	eye	40	1	1	2	1	1	3
11	Azienda D - RIPR. CA	2015, Jan	lung	170*	1	1	2	1	1	4
12	Azienda E - Sito 2 SVEZZ.	2015, Oct	nasal swab	40	1	1	2	1	1	3
13	Azienda E - Sito 2 SVEZZ.	2015, Oct	lung	40	1	1	2	1	1	3
14	Azienda E - Sito 2 SVEZZ.	2015, Oct	eye	40	1	1	2	1	1	3
15	Azienda F - Sito 2 SVEZZ.	2016, Dec	lung	176*	1	1	1	1	8	3
16	Azienda F - Sito 2 SVEZZ.	2016, Dec	joint	176*	1	1	1	1	8	3
17	Azienda G - Sito 2 SVEZZ	2017, Jul	peritoneum	176*	1	1	1	1	8	3
18	Azienda G - Sito 2 SVEZZ	2017, Jul	lung	176*	1	1	1	1	8	3
19	Azienda H - RIPR. CC	2014, May	lung	70	1	1	6	1	1	3
20	Azienda H - RIPR. CC	2018, May	nasal swab	171*	3	1	6	1	1	3
21	Azienda H - RIPR. CC	2020, Jun	joint	171*	3	1	6	1	1	3
22	Azienda H - RIPR. CC	2020, Jun	joint	171*	3	1	6	1	1	3
23	Azienda H - RIPR. CC	2021, Mar	joint	178*	3	1	6	21*	1	3
24	Azienda H - RIPR. CC	2021, Sep	joint	178*	3	1	6	21*	1	3
25	Azienda H - RIPR. CC	2021, Sep	pericardium	178*	3	1	6	21*	1	3
26	Azienda H - RIPR. CC	2022, Dec	lung	171*	3	1	6	1	1	3
27	Azienda I - RIPR. CC	2020, May	nasal swab	173*	3	1	2	1	16*	3
28	Azienda I - RIPR. CC	2021, Nov	lung	173*	3	1	2	1	16*	3
29	Azienda I - RIPR. CC	2022, Jul	lung	173*	3	1	2	1	16*	3
30	Azienda I - RIPR. CC	2023, Sep	lung	179*	29*	1	2	1	16*	3
31	Azienda J - Sito 2 SVEZZ.	2022, Apr	joint	30	10	7	4	1	1	3
32	Azienda J - Sito 2 SVEZZ.	2022, Apr	brain	30	10	7	4	1	1	3
33	Azienda J - Sito 2 SVEZZ.	2022, Apr	joint	30	10	7	4	1	1	3
34	Azienda J - Sito 2 SVEZZ.	2022, Apr	brain	30	10	7	4	1	1	3
35	Azienda K - Sito 2 SVEZZ.	2022, Nov	lung	168*	10	1	2	12	1	15*
36	Azienda K - Sito 2 SVEZZ.	2022, Nov	pericardium	168*	10	1	2	12	1	15*
37	Azienda K - Sito 2 SVEZZ.	2022, Nov	joint	168*	10	1	2	12	1	15*
38	Azienda L - RIPR. CA	2021, Mar	joint	170*	1	1	2	1	1	4
39	Azienda L - RIPR. CA	2021, Mar	lung	40	1	1	2	1	1	3
40	Azienda M - RIPR. CC	2022, Dec	pericardium	170*	1	1	2	1	1	4
41	Azienda M - RIPR. CC	2023, Dec	pericardium	170*	1	1	2	1	1	4

Tabella 1. Elenco dei campioni esaminati. RIPR. CC = riproduzione ciclo chiuso; RIPR. CA = riproduzione ciclo aperto; Sito 2 SVEZZ. = Sito 2 Svezzamento. * indica i nuovi ST e alleli trovati.

Table 1. List of all samples analyzed. RIPR. CC = Farrow-to-finish farm. RIPR. CA = farrow-to-weaning; Sito 2 SVEZZ. = Site 2 Weaning. * indicates the new ST and alleles founded.

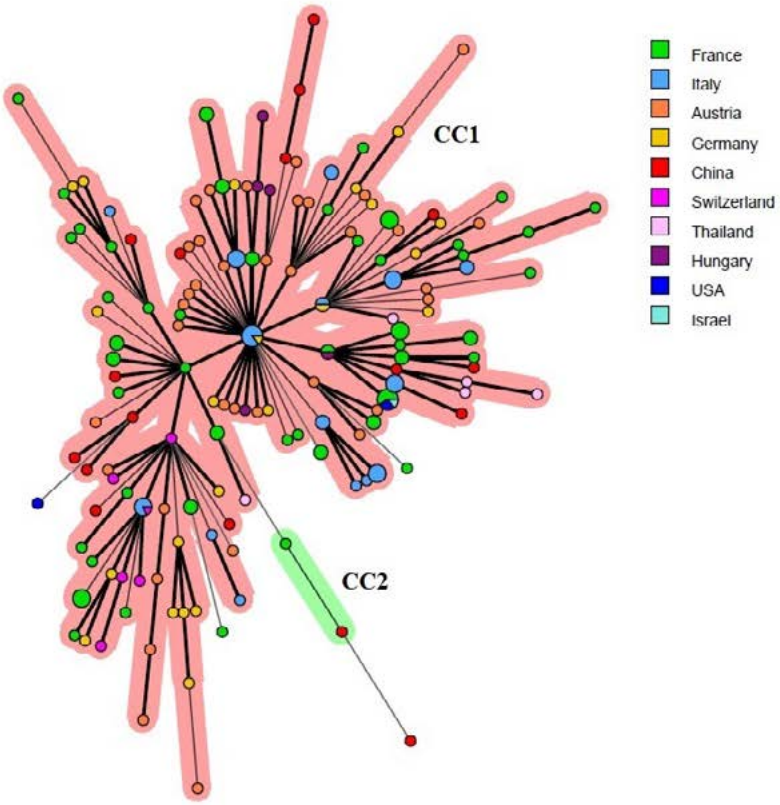


Figura 1. *Minimum Spanning Tree:* ceppi totali depositati in *PubMLST* e ceppi italiani. Ogni cerchio rappresenta un *Sequence Type* (ST), rappresentato con differenti colori e grandezza in accordo rispettivamente con il Paese di origine e la numerosità degli isolati. Le linee che congiungono i cerchi sono rappresentate con differente spessore in base al numero di differenze alleliche tra i ST (linea spessa = 1 differenza allelica, linea sottile = 2 differenze alleliche). Gli aloni colorati indicano il *clonal complex* (CC1 and CC2). ST esclusi dai *clonal complex* sono definiti come *singletons*.
Figure 1. *Minimum Spanning Tree:* strains uploaded in *PubMLST* and Italian strains. Each circle corresponds to a *Sequence Type* (ST), represented with different colors and size according to the country of isolation and the number of isolates, respectively. The lines joining the circles are represented with different thickness depending on the number of allelic differences between the respective STs (bold = 1 allelic difference, plain = 2 allelic differences). Coloured areas depict the *clonal complex* (CC1 and CC2). STs excluded from *clonal complexes* are defined as *singletons*.

Al fine verificare eventuali correlazioni tra genotipo e sito di campionamento, sono stati presi in considerazione 23 campioni provenienti da 10 aziende (azienda A, B, D, E, F, G, H, J, K e L) e per ciascuna azienda sono stati selezionati ceppi isolati da diverse matrici durante il medesimo "caso diagnostico". Come si può osservare in **Tabella 2** e **Figura 2**, in 7 aziende su 10 il ST rilevato, è identico per le diverse matrici campionate in quel determinato "caso diagnostico". In tre aziende (D, L e B) si osservano, invece, ST diversi nelle differenti matrici campionate.

Dall'analisi dei ceppi collezionati in 4 aziende da riproduzione a ciclo chiuso (azienda A, H, I e M) nei diversi anni, si evidenzia la sostanziale ripetizione nel tempo di determinati ST o di ST strettamente correlati (**Tabella 3** e **Figura 2**).

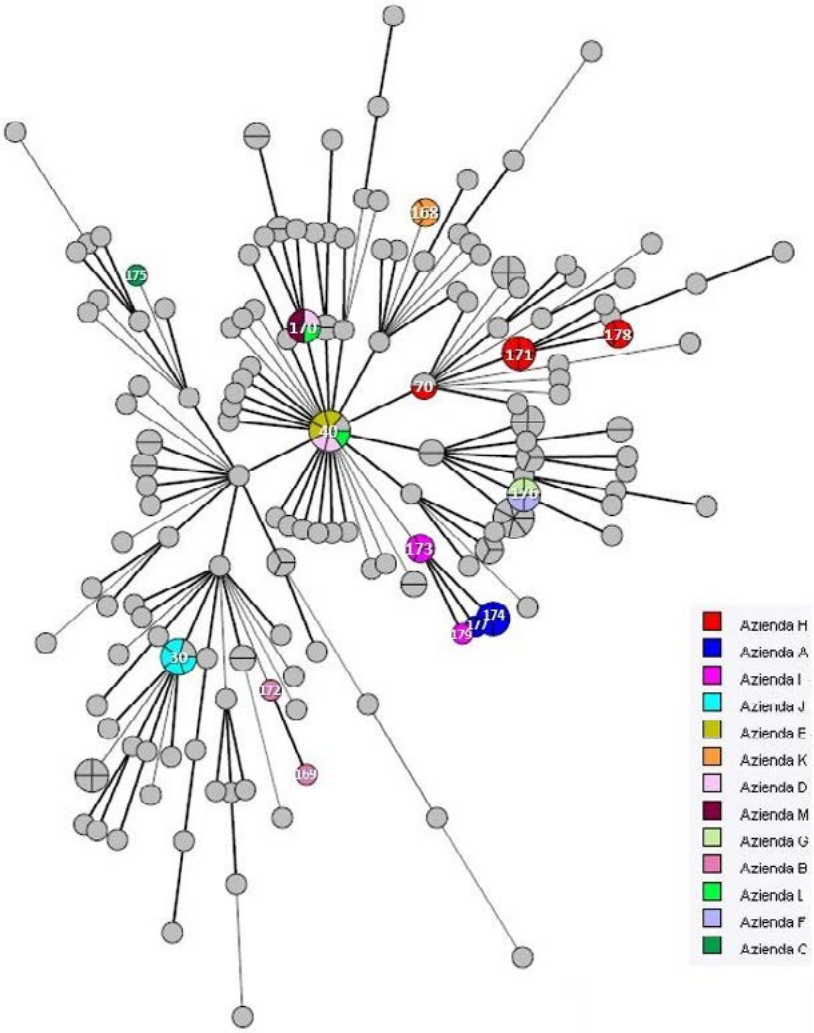


Figura 2. *Minimum Spanning Tree:* ceppi italiani. Ogni cerchio rappresenta un *Sequence Type* (ST), rappresentato con differenti colori e grandezza in accordo rispettivamente con il Paese di origine e la numerosità degli isolati. Le linee che congiungono i cerchi sono rappresentate con differente spessore in base al numero di differenze alleliche tra i ST (linea spessa = 1 differenza allelica, linea sottile = 2 differenze alleliche).

Figure 2. *Minimum Spanning Tree:* Italian strains. Each circle corresponds to a *Sequence Type* (ST), represented with different colors and size according to the country of isolation and the number of isolates, respectively. The lines joining the circles are represented with different thickness depending on the number of allelic differences between the respective STs (bold = 1 allelic difference, plain = 2 allelic differences).

Azienda	Fonti	ST	Profilo allelico					
			dnaA	rpoB	gyrB	gltX	adk	gmk
Azienda A	lung	174	3	1	2	1	16	16
	joint	174	3	1	2	1	16	16
Azienda B	lung	169	10	1	2	20	1	4
	pericardium	172	10	1	4	20	1	4
Azienda D	lung	170	1	1	2	1	1	4
	nasal swab	40	1	1	2	1	1	3
	eye	40	1	1	2	1	1	3
Azienda E	nasal swab	40	1	1	2	1	1	3
	lung	40	1	1	2	1	1	3
	eye	40	1	1	2	1	1	3
Azienda F	joint	176	1	1	1	1	8	3
	lung	176	1	1	1	1	8	3
Azienda G	peritoneum	176	1	1	1	1	8	3
	lung	176	1	1	1	1	8	3
Azienda H	joint	178	3	1	6	21	1	3
	pericardium	178	3	1	6	21	1	3
Azienda J	joint	30	10	7	4	1	1	3
	brain	30	10	7	4	1	1	3
Azienda K	joint	168	10	1	2	12	1	15
	lung	168	10	1	2	12	1	15
	pericardium	168	10	1	2	12	1	15
Azienda L	lung	40	1	1	2	1	1	3
	joint	170	1	1	2	1	1	4

Tabella 2. Ceppi isolati da diverse matrici di prelievo dello stesso "caso diagnostico".
Table 2. Strains isolated from different sources in the same "diagnostic case".

Azienda	Anno	ST	Profilo allelico					
			dnaA	rpoB	gyrB	gltX	adk	gmk
Azienda A	2017, Oct	174	3	1	2	1	16	16
	2020, Apr	174	3	1	2	1	16	16
	2020, May	177	3	1	2	1	16	4
	2021, Jan	174	3	1	2	1	16	16
Azienda H	2014, May	70	1	1	6	1	1	3
	2018, May	171	3	1	6	1	1	3
	2020, Jun	171	3	1	6	1	1	3
	2021, Mar	178	3	1	6	21	1	3
	2021, Sep	178	3	1	6	21	1	3
	2022, Dec	171	3	1	6	1	1	3
Azienda I	2020, May	173	3	1	2	1	16	3
	2021, Nov	173	3	1	2	1	16	3
	2022, Jul	173	3	1	2	1	16	3
	2023, Sep	179	29	1	2	1	16	3
Azienda M	2022, Dec	170	1	1	2	1	1	4
	2023, Dec	170	1	1	2	1	1	4

Tabella 3. Ceppi isolati da aziende da riproduzione a ciclo chiuso dal 2014 al 2023.
Table 3. Strains isolated from farrow-to-finish farm from 2014 to 2023.

DISCUSSIONE

Nel presente studio sono stati genotipizzati tramite metodica MLST 41 ceppi di MHR isolati da suino dal 2014 al 2023 provenienti da differenti aziende del Nord Italia, con lo scopo di comprendere le capacità di differenziazione di questa metodica e la sua conseguente applicabilità nel settore suinicolo, al fine di porre le basi per una corretta comprensione delle modalità di circolazione intra ed inter-aziendale di questo microrganismo. Tra i diversi protocolli di MLST per MHR presenti in bibliografia è stato scelto quello di Tocqueville e Trüeb in quanto permette di classificare gli isolati in modo univoco con l'assegnazione di uno specifico ST e consente il confronto con i dati disponibili su PubMLST a livello globale. Tutti i ceppi analizzati in questo studio e quelli già depositati in PubMLST sono stati rappresentati in un MST, nel quale si osserva la presenza di un unico grande *clonal complex* (CC1) che raggruppa la maggior parte degli ST, inclusi gli isolati italiani. Fanno eccezione i ST 29 e ST 150 che vanno a formare un ulteriore *clonal complex* (CC2) di dimensioni ridotte, e n. 4 *Singleton* (**Figura 1**). Rappresentando con colori diversi gli ST in base alla provenienza degli isolati è evidente l'assenza di correlazione tra ST ed il Paese di origine. Tale evidenza potrebbe essere giustificata da una notevole o quantomeno elevata interrelazione tra le differenti aree di provenienza, oppure ad una caratteristica specifica di MHR. Per *Mycoplasma synoviae*, per esempio, Wei *et al.*, 2023 hanno evidenziato una correlazione tra i ST e le rispettive aree di origine dei ceppi analizzati.

Concentrando l'attenzione sugli isolati italiani, sono state prese in considerazione 10 aziende (azienda A, B, D, E, F, G, H, J, K e L) per le quali erano disponibili ceppi isolati da diverse matrici dello stesso "caso diagnostico". In **Tabella 2** sono elencati i campioni presi in esame con le relative matrici di isolamento. In 7 aziende (azienda A, E, F, G, H, J e K) il ST rimane invariato per sedi di campionamento diverse; mentre nelle restanti 3 aziende (azienda B, D e L) al cambiare del sito di prelievo si osservano differenti ST. Tuttavia, in **Figura 2** è possibile notare come in queste ultime 3 aziende i ST, benchè diversi, siano strettamente correlati. Infatti, tali ST presentano una sola differenza nel profilo allelico: ST 169 e ST 172 (azienda B), ST 40 e ST 170 (aziende D e L).

In generale quindi, i dati da noi osservati lasciano supporre che non esista una correlazione tra i ST e le diverse matrici organiche di prelievo, come già precedentemente documentato in letteratura (Bünger *et al.*, 2021; Clavijo *et al.*, 2019). Il ritrovamento di differenti ST nello stesso evento clinico potrebbe quindi essere spiegato con la copresenza in allevamento di ceppi con ST diversi oppure con variazioni limitate dei geni studiati.

Infine, sono state prese in considerazione 4 aziende da riproduzione a ciclo chiuso (azienda A, H, I e M) (**Tabella 3**). Per ognuna di queste sono stati selezionati ceppi diversi e isolati nel corso degli anni (2014-2023). Per l'azienda M per la quale erano disponibili 2 prelievi a distanza di un anno il ST è stato mantenuto (ST 170), mentre per le altre 3 aziende per le quali erano disponibili prelievi eseguiti in un arco temporale più ampio si può osservare il mantenimento dello stesso ST o la presenza di ST strettamente correlati tra loro (**Figura 2**) in quanto caratterizzati da una sola differenza allelica. Ad esempio, per l'azienda H (**Tabella 3**) si osserva come nel 2014 fosse presente il ceppo ST 70; nel 2018 e nel 2022 è stata riscontrata in 3 isolati la presenza del ST 171 (che differenzia solo per il gene *dnaA* dal ST 70), mentre nel 2021 si è riscontrata in 2 isolati la presenza del ST 178 (che differenzia solo per il gene *gltX* dal ST 171 e per i geni *dnaA* e *gltX* dal ST 70). In **Figura 2** si può notare la disposizione grafica dei 3 ST (ST 70, ST 171 e ST 178) che evidenzia una stretta correlazione. In questo caso potrebbe anche essere possibile ipotizzare una graduale variazione progressiva del ceppo all'interno dell'allevamento in funzione del tempo, anche se è interessante notare come nell'ultimo campionamento il ceppo isolato risulta essere il ST 171 segno di una instabilità della popolazione microbica studiata tipica del genere *Mycoplasma*. Anche per l'azienda A

(ST 174 e ST 177) e per l'azienda I (ST 173 e ST 179) si riscontrano dati simili (**Figura 2**) che speriamo di confermare negli anni futuri.
Considerato che queste aziende presentano una gestione a ciclo chiuso è probabile che il mantenimento dello stesso ST o di ST strettamente correlati all'interno dell'azienda sia dovuto alla compresenza di animali di varie categorie (riproduzione, svezzamento e ingrasso) che permette una continua circolazione di MHR. Situazioni stressogene per gli animali, come infezioni concomitanti causate da altri patogeni o legate agli ambienti di stabulazione possono potenzialmente alterare l'equilibrio tra il suino e MHR e agire da *trigger* permettendo allo stesso di determinare patologia (polisierosite, pericardite) o compartecipare nella PRDC. È opportuno evidenziare che l'introduzione di differenti ST in popolazioni infette potrebbe creare le condizioni adatte ad uno squilibrio tra ospite e microrganismo, aumentando le potenzialità patogene di MHR, che sulla base dei dati attualmente a disposizione viene considerato come patogeno opportunista.

CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro hanno permesso una valutazione preliminare dell'utilità del sistema di genotipizzazione dei ceppi di MHR tramite MLST in diverse tipologie di allevamento del suino nel nostro Paese. Per poter analizzare e comprendere le dinamiche di diffusione di questo microrganismo nella realtà suinicola italiana si prevede di ampliare, con ulteriori studi, il numero di campioni da analizzare coinvolgendo un maggior numero di aziende. Allo stato attuale, la valutazione preliminare effettuata permette di affermare che MLST rappresenta un valido strumento di supporto per interpretare le correlazioni tra i ceppi circolanti nelle diverse tipologie aziendali e comprendere le modalità di diffusione di MHR a livello intra ed inter-aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Bünger, M., Posch, M., Wiesauer, J., Loncaric, I., Cabal Rosel, A., Ruppitsch, W., Ladinig, A., & Spergser, J. (2021). A core genome multilocus sequence typing scheme for *Mycoplasma hyorhinis*. Veterinary microbiology, 262, 109249. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109249
2. Clavijo, M. J., Sreevatsan, S., Johnson, T. J., & Rovira, A. (2019). Molecular epidemiology of *Mycoplasma hyorhinis* porcine field isolates in the United States. PloS one, 14(10), e0223653. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223653
3. Földi, D., Bekő, K., Felde, O., Kreizinger, Z., Kovács, Á. B., Tóth, F., Bányai, K., Kiss, K., Biksi, I., & Gyuranecz, M. (2020). Genotyping *Mycoplasma hyorhinis* by multi-locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. Veterinary microbiology, 249, 108836. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108836
4. Klein, U., Földi, D., Belecz, N., Hrivnák, V., Somogyi, Z., Gastaldelli, M., Merenda, M., Catania, S., Dors, A., Siesenop, U., Vyt, P., Kreizinger, Z., Depondt, W., & Gyuranecz, M. (2022). Antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from five European countries between 2019 and 2021. *PloS one*, *17*(8), e0272903. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272903
5. Lee, J. A., Oh, Y. R., Hwang, M. A., Lee, J. B., Park, S. Y., Song, C. S., Choi, I. S., & Lee, S. W. (2016). *Mycoplasma hyorhinis* is a potential pathogen of porcine respiratory disease complex that aggravates pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Veterinary immunology and immunopathology, 177, 48–51. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.06.008
6. Matucci, A., Stefani, E., Gastaldelli, M., Rossi, I., De Grandi, G., Gyuranecz, M., & Catania, S. (2020). Molecular Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Outbreaks:

A Last Decade Study on Italian Farms Using GTS and MLST. Vaccines, 8(4), 665. https://doi.org/10.3390/vaccines8040665

7. Palzer A. et al. (2020) *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in pig herds. In: Maes D., et al. eds. Mycoplasmas in swine. 1st edition, 248-265.
8. Tocqueville, V., Ferré, S., Nguyen, N. H., Kempf, I., & Marois-Créhan, C. (2014). Multilocus sequence typing of *Mycoplasma hyorhinis* strains identified by a real-time TaqMan PCR assay. Journal of clinical microbiology, 52(5), 1664–1671. https://doi.org/10.1128/JCM.03437-13
9. Trüeb, B., Catelli, E., Luehrs, A., Nathues, H., & Kuhnert, P. (2016). Genetic variability and limited clonality of *Mycoplasma hyorhinis* in pig herds. Veterinary microbiology, 191, 9–14. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.01
10. Wei, X., Chen, W., Sun, Q., Zhong, Q., Yan, Z., Zhou, Q., Cao, Y., Chen, F., & Zhang, X. (2023). Epidemiological investigations and multilocus sequence typing of *Mycoplasma synoviae* isolates from chicken farms in China. Poultry science, 102(6), 102006. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102006
11. WOAH, 2023. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 12th edition (2023), Chapter 3.3.5. https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/
12.

RESISTENZA EMERGENTE AL FLORFENICOLO IN ISOLATI DI ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE DA UN ALLEVAMENTO SUINO ITALIANO

EMERGING RESISTANCE TO FLORFENICOL IN ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE ISOLATES FROM AN ITALIAN PIG HERD

MASSACCI, F.R.[1]; CUCCO, L.[1]; USTULIN, M.[2]; ALBINI, E.[1]; PANICCIÀ, M.[1]; VIO, D.[2]; CINTHI, M.[3]; COCCITTO S.N.[4]; GIOVANETTI E.[3]; BRENCIANI, A.[4]; MAGISTRALI C.F.[1,5]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati'*
[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*
[3] *Department af Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy*
[4] *Unit of Microbiology, Department of Biomedical Sciences and Public Health, Polytechnic University of Marche Medical School, Ancona, Italy;*
[5] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

Parole chiave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, antibiotico-resistenza, florfenicolo
Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, antibiotic-resistance, florfenicol

Riassunto
Actinobacillus pleuropneumoniae è l'agente eziologico della pleuropolmonite contagiosa suina. Il controllo di questa malattia è ancora affidato agli antibiotici, tra cui il florfenicolo. Purtroppo, le segnalazioni di resistenze in *A. pleuropneumoniae* sono in aumento in tutto il mondo ad eccezione dell'Italia. La resistenza ai fenicoli è codificata dal gene *floR,* che è localizzato su plasmidi. Questo lavoro descrive per la prima volta in Italia l'emergere della resistenza al florfenicolo, associata alla presenza del gene *floR*, in due isolati di *A. pleuropneumoniae* (B2176 e B2177), provenienti da un allevamento suinicolo del nord Italia. I test di sensibilità agli antibiotici hanno mostrato che entrambi gli isolati sono sensibili a alle molecole testate, tranne al florfenicolo per il quale B2176 ha un profilo di sensibilità intermedia, mentre B2177 risulta resistente. I due isolati presentavano geni codificanti per la tossina ApxII, considerata moderatamente tossica, e ApxIII, che caratterizza ceppi di elevata virulenza. L'analisi del genoma ha rilevato che *floR* **è** localizzato su un nuovo plasmide di 5.588 bp, qui nominato pAp-*floR,* simile al plasmide pMVSCS1 descritto in *Mannheimia varigena,* dal quale però si differenzia per un diverso corredo di geni di resistenza. Risulta necessario un costante monitoraggio delle resistenze nei batteri patogeni e proseguire lungo la strada già intrapresa per l'impiego prudente degli antibiotici negli allevamenti.

Abstract
Actinobacillus pleuropneumoniae is responsible for porcine pleuropneumonia. The control of the disease is still based on antibiotics, such as florfenicol. Unfortunately, reports on antibiotic resistance in *A. pleuropneumoniae* are increasing worldwide, except in Italy. Phenicol resistance is encoded by the *floR* gene, which is located on plasmids. This work describes for the first time in Italy the emergence of resistance to florfenicol, associated with the presence of the *floR* gene, in two isolates of *A. pleuropneumoniae* (B2176 and B2177) collected from a pig farm. Both isolates were susceptible to the tested antibiotic molecules, except for florfenicol for which B2176 showed an intermediate profile, while B2177 was resistant. The

two isolates had genes coding for the toxin ApxII, considered moderately toxic, and ApxIII, which characterizes strains of high virulence. Genome analysis revealed that *floR* was located on a new 5,588 bp plasmid, named pAp-floR, similar to the pMVSCS1 plasmid described in *Mannheimia varigena*, from which it differed by a set of resistance genes. It is necessary to constantly monitor resistance in pathogenic bacteria and to continue along the path already undertaken for the prudent use of antibiotics in livestock farming.

INTRODUZIONE

Actinobacillus pleuropneumoniae, agente eziologico della pleuropolmonite contagiosa suina, è un membro della famiglia delle *Pasteurellaceae* causa di perdite significative economiche nell'allevamento suino in tutto il mondo (Zimmerman et al., 2019). *A. pleuropneumoniae* è solitamente suddiviso in due biovar (biovar 1 e biovar 2) in base alla dipendenza dal nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) (Zimmerman et al., 2019). Ad oggi sono stati descritti 19 sierotipi e tra questi i sierotipi 1, 5, 9 e 11 sono altamente virulenti e frequentemente osservati in casi di pleuropolmonite suina (Dubreuil et al., 2000). Infatti, sebbene tutti i ceppi di *A. pleuropneumoniae* siano potenzialmente patogeni, la gravità dell'infezione varia notevolmente a seconda del sierotipo di appartenenza (Frey, 1995). Questa differenza dipende principalmente dalla produzione di varie citotossine quali Apx (ApxI, II, III e IV). Secondo Frey (1995), i sierotipi più virulenti di *A. pleuropneumoniae* producono sia le tossine ApxI che ApxII.

Il controllo della pleuropolmonite contagiosa suina è ancora largamente affidato agli antibiotici. In base alle attuali Linee Guida della Regione Emilia Romagna, tra le molecole antibiotiche di prima scelta nel trattamento della pleuropolmonite, sono riportate le cefalosporine I-II generazione, gli amfenicoli, le tetracicline ed i sulfamidici (Bassi et al., 2022). Il florfenicolo, appartenente alla classe degli amfenicoli, è un farmaco antimicrobico ad ampio spettro ampiamente utilizzato per il trattamento di malattie respiratorie e altre infezioni batteriche patogene negli allevamenti di suini. Questo antibiotico è approvato ad uso esclusivo per la medicina veterinaria e grazie ad una modificazione strutturale non determina effetti collaterali che hanno vietato l'uso del cloramfenicolo negli animali da reddito (Reg. UE 37/2010). Sempre in base delle Linee guida, l'uso del florfenicolo è consigliabile solo in caso di resistenze nei confronti del tiamfenicolo o qualora si verifichi insuccesso terapeutico. L'uso estensivo del tiamfenicolo, comunque, favorisce l'emergenza e/o diffusione di meccanismi di resistenza "totipotenti" agli amfenicoli, pertanto le Linee guida consigliano di limitarne l'uso specialmente se per via orale e nella somministrazione di massa (Bassi et al., 2022).

Probabilmente in seguito alla pressione selettiva generata dall'impiego di antibiotici, le segnalazioni di resistenze in *A. pleuropneumoniae* sono attualmente in aumento in tutto il mondo (de Jong et al., 2014; Blondeau and Fitch, 2019; Hennig-Pauka et al., 2021; Vilaró et al., 2023)pigs and poultry. In the current study, 1001 isolates from cattle and pig respiratory tract infections were tested for their antimicrobial susceptibilities. Non-replicate lung samples or nasopharyngeal/nasal swabs were collected from animals with acute clinical signs in 11 countries during 2002-2006. Pasteurella multocida and Mannheimia haemolytica from cattle and P. multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae and Streptococcus suis from pigs were isolated by standard methods. S. suis was also isolated from meningitis cases. MICs of 16 antibiotics were assessed centrally by broth microdilution following CLSI recommendations. Results were interpreted using CLSI breakpoints where available. P. multocida (231.

Isolati di *A. pleuropneumoniae* resistenti al florfenicolo sono stati segnalati sporadicamente, principalmente nei paesi asiatici e, come per altri batteri Gram-negativi, la resistenza era generalmente associata alla presenza del gene *floR* (de Jong et al., 2014; Yao et al., 2023) pigs and poultry. In the current study, 1001 isolates from cattle and pig respiratory tract

infections were tested for their antimicrobial susceptibilities. Non-replicate lung samples or nasopharyngeal/nasal swabs were collected from animals with acute clinical signs in 11 countries during 2002-2006. Pasteurella multocida and Mannheimia haemolytica from cattle and P. multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae and Streptococcus suis from pigs were isolated by standard methods. S. suis was also isolated from meningitis cases. MICs of 16 antibiotics were assessed centrally by broth microdilution following CLSI recommendations. Results were interpreted using CLSI breakpoints where available. P. multocida (231. Il gene *floR* codifica una proteina da efflusso responsabile della resistenza ai fenicoli, cloramfenicolo e florfenicolo ed è localizzato su plasmidi di varie dimensioni (Yao et al., 2023; Zhu et al., 2024)resistance profiles of nine commonly used antibiotics of A. pleuropneumoniae and P. multocida isolates of swine origin from diierent regions of China were investigated by determination of minimum inhibitory concentrations (MICs o associato ad *Integrative and Conjugative Elements* (ICEs) (Li et al., 2018; Zhu et al., 2024)"ISSN":"14602091","PMID ":"29029160","abstract":"Objectives: To characterize ICEApl2, an SXT-related integrative and conjugative element (ICE.

A livello nazionale, dati sulla resistenza al florfenicolo negli isolati di *A. pleuropneumoniae* non sono disponibili. Nel presente studio, identifichiamo per la prima volta due isolati di *A. pleuropneumoniae*, provenienti da un allevamento suinicolo del nord Italia, resistenti al florfenicolo per la presenza del gene *floR*.

MATERIALI E METODI

Isolamento batterico e test microbiologici

I ceppi batterici di *A. pleuropneumoniae* (B2176 e B2177) sono stati isolati da due suini affetti da pleuropolmonite contagiosa conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - sede Pordenone. Nello specifico, il ceppo B2176, isolato nel 2022, proveniva da un polmone di un suino di circa 80 kg di peso. I dati anamnestici riportano vaccinazione per *A. pleuropneumoniae* e trattamento farmacologico con florfenicolo nell'azienda di provenienza. Il ceppo B2177, isolato nel 2023, risultava esser isolato da un polmone di un suino di circa 140 kg di peso, trattato con florfenicolo in associazione con tiamulina e clortetraciclina. All'esame anatomo patologico si rilevavano in entrambi i polmoni, aree rotondeggianti colpite da polmonite fibrino-necrotico-emorragica associata pleurite fibrinosa a carico dei lobi caudali.

I due soggetti provenivano da un allevamento da riproduzione a ciclo semi-chiuso con circa 600 scrofe, ed erano stabulati in un sito di ingrasso che ospita abitualmente 1400 animali. Nella scrofaia di origine è nota la diffusione endemica di *A. pleuropneuomiae* con casistica ricorrente in magronaggio e in svezzamento. Nel 2017, si sono verificati primi casi di polmonite fibrino-necrotico-emorragica in soggetti sottoscrofa.

Per entrambi i campioni l'esame batteriologico è stato effettuato prelevando, con un tampone sterile, materiale patologico dalla lesione e seminando su terreni Eosin Methylen Blue agar (EMB), agar sangue (AS) incubati in aerobiosi per 24 ore a 37°C ed AS con uno striscio di *Staphylococcus aureus* incubato in microaerofilia per 24 ore a 37 °C. Dopo 24 e 48 ore di incubazione, eventuali colonie batteriche con morfologia riferibile ad *A. pleuropneumoniae* cresciute nell'alone di emolisi di *S. aureus* sono state trapiantate su AS con striscio di *S. aureus*, per conferma del satellitismo, e su agar cioccolato (AC). L'identificazione è stata effettuata con metodi biochimici classici, verificando che il ceppo isolato fosse catalasi negativo e ureasi positivo. Entrambi 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 (SENSITITRE™, ThermoScientific). Brevemente, **è stato allestito un inoculo trasferendo 50 µl di una sospensione batterica a 0,5** McFarland preparata da una

coltura fresca, in 11 ml di terreno VFM (Veterinary Fastidiuos Medium) addizionato a 220 µl di LHB (eritrociti lisati di cavallo) e 220 µl di supplemento C. Successivamente, 50 µl di inoculo sono stati distribuiti su ciascun pozzetto di una micropiastra per MIC. La micropiastra inoculata è stata incubata a 35±1°C per 24 ore in microaerofilia (5% di CO_2). Il pannello comprendeva le seguenti molecole: amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicolo, flumequina, gamitromicina, kanamicina, spectinomicina, tetraciclina, tiamulina, tildipirosina, tilmicosina, trimetoprim/sulfonamidi, tulatromicina. Al termine dell'incubazione la lettura è stata effettuata con sistema automatizzato, identificando come valore di MIC di ciascun antibiotico in esame, la concentrazione più bassa presente nel pozzetto in cui non si è osservata crescita batterica. I valori di MIC sono stati interpretati utilizzando i breakpoint raccomandati dal manuale CLSI VET01S, ad eccezione di flumequina e kanamicina per cui sono stati utilizzati i break point suggeriti dalla Società Francese di Microbiologia in ambito veterinario in quanto non disponibili sul manuale CLSI (CLSI, 2024).

Analisi genomica

Il DNA genomico dei due isolati di *A. pleuropneumoniae* sono stati estratti utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) per poi essere sottoposti a sequenziamento utilizzando la piattaforma Illumina MiSeq. Dopo la valutazione della qualità delle *reads*, le sequenze sono state assemblate usando SPAdes *genome assembler* v3.11.1 (Prjibelski et al., 2020). Per confrontare i nostri isolati con quelli presenti nei database internazionali, sono state scaricati 35 genomi completi di *A. pleuropneumoniae* tra quelli disponibili in NCBI. I 35 genomi sono stati analizzati insieme ai 2 genomi oggetto del nostro studio. Dopo l'annotazione tramite Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014) è stato creato un albero filogenetico di massima verosimiglianza con FastTree 2.1.11 (Price et al., 2010) utilizzando l'allineamento del *core genome* prodotto da Roary v3.11.3 (Page et al., 2015). Al fine di capire se i due isolati fossero cloni, le identità delle sequenze nucleotidiche sono state studiate utilizzando il tool online CSI Phylogeny 1.4 del CGE (https://cge.food.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/). Le sequenze dei 2 isolati di *A. pleuropneumoniae* sono state utilizzate per identificare il profilo di virulenza mediante la ricerca dei geni codificanti le tossine ApxI, ApxII, ApxIII, ApxIV utilizzando BLASTN v2.13.0 (Camacho et al., 2009) e i geni di resistenza agli antimicrobici che sono stati analizzati con ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate). Il cutoff utilizzato per determinare la presenza dei geni di resistenza agli antibiotici è stato lo stesso per i geni codificanti le tossine Apx (*coverage* ≥ 95% e identità ≥ 99%).

Stabilità del gene *floR*

Al fine di valutare l'eventuale perdita del gene *floR* in assenza di pressione selettiva, entrambi gli isolati sono stati seminati per 10 giorni consecutivi su terreno di coltura specifico (Agar Cioccolato) privo di florfenicolo ed incubati a 37 °C in atmosfera arricchita con 5% CO_2. Il DNA totale dei ceppi B2176 e B2177 è stato estratto mediante il GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lituania). Per valutare la presenza del gene *floR*, sono stati eseguiti esperimenti di PCR, utilizzando specifiche coppie di primer (*floR*-FW 5' – GCCTTTGTCGCTTTCCGTCT – 3' e *floR*-REV 5' – AAAGCCGACAGTGTAAACCC – 3') dimensione amplificato 354 bp. Condizioni di PCR: Denaturazione iniziale 94 **°C per 4 minuti (1 ciclo); Denaturazione 94 °C per 30 secondi,** Annealing 59 **°C per 30 secondi, Elongazione 72 °C per 30 secondi (30 cicli); Elongazione finale 72 °C (1 ciclo).**

RISULTATI

I test di sensibilità agli antibiotici hanno mostrato che entrambi gli isolati di *A. pleuropneumoniae* erano sensibili a tutte le molecole antibiotiche testate, tranne al florfenicolo per il quale B2176 aveva un profilo di sensibilità intermedia (MIC=4 **µg**/mL) mentre B2177 risultava resistente (MIC=8 **µg**/mL).

L'analisi dei due genomi ha mostrato che B2176 e B2177 erano dei cloni, in quanto differivano di un solo SNP. Inoltre, B2176 e B2177 risultano positivi ad ApxII e ApxIII.
L'analisi dei geni di antibiotico-resistenza dei due isolati ha evidenziato la presenza del solo gene *floR*. Un'approfondita analisi del genoma dei due ceppi ha rilevato che il gene *floR* era localizzato su un nuovo plasmide di 5.588 bp, qui nominato pAp-*floR* (GenBank accession no. OR824989). Le ORFs di pAp-*floR* e le loro rispettive funzioni sono indicate in Tabella 1. Analisi eseguite con BLASTN hanno inoltre mostrato che il plasmide pAp-*floR* aveva un'elevata identità nucleotidica (99%) e coverage (60%) con il plasmide pMVSCS1 (5,621 bp) (GenBank accession no. AJ319822) di *Mannheimia varigena* MVSCS1 di origine suina (Kehrenberg and Schwarz, 2002). Il plasmide pMVSCS1 veicolava 4 geni di antibiotico-resistenza quali: *str*A/B (responsabili della resistenza alla streptomicina), *sul*III (responsabili della resistenza al sulfamidici) e *cat*AIII (responsabile della resistenza al cloramfenicolo), mentre in pAp-*floR* questi geni erano rimpiazzati dal solo gene *floR* (Figura 1).
Il plasmide pAp-*floR* degli isolati B2176 e B2177 è stato quindi confrontato con tre plasmidi *floR* recentemente identificati da Yao et al. (2023) in *A. pleuropneumoniae*: (i) pMAF5 (GenBank accession no. CP100664); (ii) pMAF6 (GenBank accession no. CP100663); (iii) pFA11 (GenBank accession no. CP100665) (Figura 1). Il confronto delle sequenze nucleotidiche ha evidenziato che pAp-*floR* mostrava un'identità nucleotidica del 99% e un *coverage range* compreso fra 25-51% con i tre plasmidi *floR* sopraelencati, mostrando profonde e significative differenze sia in contenuto di geni di antibiotico resistenza che come *backbone* plasmidico (Figura 1).
I saggi di stabilità hanno inoltre dimostrato che negli isolati B2176 e B2177 il gene *floR* era stabilmente conservato anche in assenza di pressione selettiva.
Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, come mostrato in Figura 2, i 37 isolati di *A. pleuropneumoniae* erano distribuiti in numerosi cluster. I genomi di B2176 e B2177, clusterizzavano insieme ad un genoma di cui abbiamo poche informazioni in letteratura. E' interessante notare che, tra i diversi genomi inclusi nell'albero filogenetico, gli isolati provenienti dalla Cina presentavano il maggior numero di geni di antibiotico-resistenza.

DISCUSSIONE

Questo lavoro descrive per la prima volta in Italia l'emergere della resistenza al florfenicolo, associata alla presenza del gene *floR*, in due isolati di *A. pleuropneumoniae.* I due isolati, provenienti da casi di pleuropolmonite contagiosa, presentavano geni codificanti per la tossina ApxII, considerata moderatamente tossica per i macrofagi alveolari, e ApxIII, che caratterizza ceppi di elevata virulenza (Kamp et al., 1991; Frey et al., 1993). Gli isolati, sebbene originati da casi verificatesi in due anni diversi, appartenevano ad uno stesso clone.
A differenza di altri batteri Gram-negativi, come le *Enterobacteriaceae*, la resistenza al florfenicolo in *A. pleuropneumoniae* è stata segnalata raramente negli isolati di origine suina, fatta eccezione per i paesi asiatici. Infatti, in Corea, circa il 36% degli isolati di *A. pleuropneumoniae* sono risultati resistenti al florfenicolo, mentre in Cina questa percentuale si è attestata al 47,4% (de Jong et al., 2014; Yao et al., 2023). Inoltre, tutti gli isolati cinesi resistenti al florfenicolo erano anche positivi per il gene *floR* (Yao et al., 2023). E' stato precedentemente osservato che in isolati di *A. pleuropneumoniae* di origine cinese, il gene *floR* era veicolato sia da plasmidi (Yao et al., 2023) che da *Integrative and Conjugative Elements* (Li et al., 2018). La presenza del gene *floR* su elementi genetici mobili ha di fatto contribuito ad un'ampia diffusione del determinante di resistenza nei paesi asiatici.
Per quanto riguarda il continente europeo la situazione epidemiologica sembra essere notevolmente differente rispetto a quanto osservato in Asia: la resistenza a florfenicolo associata al gene *floR* in *A. pleuropneumoniae* è stata segnalata sporadicamente solo in alcuni

paesi (Priebe and Schwarz, 2003; Gutiérrez-Martín et al., 2006; Matter et al., 2007; Kucerova et al., 2011).
Negli isolati oggetto di questo lavoro, il gene *floR* era veicolato da un plasmide mai segnalato in letteratura, simile al plasmide pMVSCS1 descritto in *Mannheimia varigena,* dal quale però si differenziava per un diverso corredo di geni di resistenza, confermando quindi l'ampia variabilità genetica dei plasmidi. Inoltre, almeno in condizioni di laboratorio, il nuovo plasmide pAp-*floR* che veicolava la resistenza era stabilmente mantenuto in entrambi gli isolati anche in assenza di una pressione selettiva diretta generata da florfenicolo. Il fatto che *A. pleuropneumoniae* mantenga il plasmide anche quando non è necessario per la sua sopravvivenza fa supporre che albergarlo non richieda al batterio un grosso sforzo in termini metabolici (*fitness cost)*. É interessante notare che i due cloni, B2176 e B2177, erano isolati in due anni differenti quindi in grado di persistere stabilmente nell'allevamento infetto.
Questi elementi giocano a favore per il mantenimento di *floR* nella popolazione batterica di origine e fanno temere per una possibile diffusione di cloni di *A. pleuropneumoniae* resistenti al florfenicolo nella popolazione suina.
È necessario quindi proseguire lungo la strada già intrapresa per l'impiego prudente degli antibiotici negli allevamenti. Il costante monitoraggio delle resistenze nei batteri patogeni potrà quindi consentire l'identificazione di isolati resistenti a molecole chiave come il florfenicolo e la adozione di misure di contenimento per contrastarne la diffusione.

BIBLIOGRAFIA

1. Bassi, P., Chiara, C., Andrea, L., Giuseppe, M., Padovani Anna, Trambajolo Giovanna, T.P., 2022. LINEE GUIDA Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino.
2. Blondeau, J.M., Fitch, S.D., 2019. Mutant prevention and minimum inhibitory concentration drug values for enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin tested against swine pathogens Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida and Streptococcus suis. PLoS One 14, e0210154.
3. 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
4. CLSI, 2024. CLSI VET01S – Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for Bacteria isolated from animals. Clin. Lab. Stand. Inst. Suppl. VET01S 7th ed.
5. de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., El Garch, F., Maher, K., Morrissey, I., Butty, P., Klein, U., Marion, H., Rigaut, D., Vallé, M., 2014. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. Vet. Microbiol. 172, 202–215. doi:10.1016/j.vetmic.2014.04.008
6. Dubreuil, J.D., Gottschalk, M., Jacques, M., Mittal, K.R., 2000. Actinobacillus pleuropneumoniae surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. Anim. Heal. Res. Rev. 1, 73–93. doi:DOI: 10.1017/S1466252300000074
7. Frey, U., Huang, Y.Y., Kandel, E.R., 1993. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. Science 260, 1661–1664. doi:10.1126/science.8389057
8. Gutiérrez-Martín, C.B., Blanco, N.G. del, Blanco, M., Navas, J., Rodríguez-Ferri, E.F., 2006. Changes in antimicrobial susceptibility of Actinobacillus pleuropneumoniae isolated from pigs in Spain during the last decade. Vet. Microbiol. 115, 218–222. doi:10.1016/j.vetmic.2005.12.014
9. Hennig-Pauka, I., Hartmann, M., Merkel, J., Kreienbrock, L., 2021. Coinfections and Phenotypic Antimicrobial Resistance in Actinobacillus pleuropneumoniae Strains

Isolated From Diseased Swine in North Western Germany-Temporal Patterns in Samples From Routine Laboratory Practice From 2006 to 2020. Front. Vet. Sci. 8, 802570. doi:10.3389/fvets.2021.802570
10. Kamp, E.M., Popma, J.K., Anakotta, J., Smits, M.A., 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of Actinobacillus pleuropneumoniae by use of monoclonal antibodies. Infect. Immun. 59, 3079–3085. doi:10.1128/iai.59.9.3079-3085.1991
11. Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2002. Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from Mannheimia varigena: Identification of a multiresistance gene cluster. J. Antimicrob. Chemother. 49, 383–386. doi:10.1093/jac/49.2.383
12. Kucerova, Z., Hradecka, H., Nechvatalova, K., Nedbalcova, K., 2011. Antimicrobial susceptibility of Actinobacillus pleuropneumoniae isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases. Vet. Microbiol. 150, 203–206. doi:10.1016/j.vetmic.2011.01.016
13. Li, Yinghui, Li, Yanwen, Crespo, R.F., Leanse, L.G., Langford, P.R., Bossé, J.T., 2018. Characterization of the Actinobacillus pleuropneumoniae SXT-related integrative and conjugative element ICEApl2 and analysis of the encoded FloR protein: Hydrophobic residues in transmembrane domains contribute dynamically to florfenicol and chloramphenic. J. Antimicrob. Chemother. 73, 57–65. doi:10.1093/jac/dkx342
14. Matter, D., Rossano, A., Limat, S., Vorlet-Fawer, L., Brodard, I., Perreten, V., 2007. Antimicrobial resistance profile of Actinobacillus pleuropneumoniae and Actinobacillus porcitonsillarum. Vet. Microbiol. 122, 146–156. doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.009
15. 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, 3691–3693. doi:10.1093/bioinformatics/btv421
16. Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PLoS One 5. doi:10.1371/journal.pone.0009490
17. Priebe, S., Schwarz, S., 2003. In vitro activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 2703–2705. doi:10.1128/AAC.47.8.2703-2705.2003
18. Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., Korobeynikov, A., 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. Curr. Protoc. Bioinforma. 70, e102. doi:10.1002/cpbi.102
19. Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
20. Vilaró, A., Novell, E., Enrique-Tarancon, V., Baliellas, J., Fraile, L., 2023. Susceptibility trends of swine respiratory pathogens from 2019 to 2022 to antimicrobials commonly used in Spain. Porc. Heal. Manag. 9, 1–13. doi:10.1186/s40813-023-00341-x
21. Yao, X., Song, Q., Zhu, W., Wei, J., Shao, D., Liu, K., Li, Z., Qiu, Y., Ma, Z., Xia, L., 2023. Characterization of small plasmids carrying florfenicol resistance gene floR in Actinobacillus pleuropneumoniae and Pasteurella multocida isolates from swine in China. Front. Vet. Sci. 10:1084491.
22. Zhu, C., Cai, J., An, J., Zhang, B., Li, Y., 2024. A Florfenicol-Resistant Plasmid Shuttling Between Actinobacillus pleuropneumoniae and Glaesserella parasuis. Microb. Drug Resist. doi:10.1089/mdr.2023.0127
23. Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G., 2019. Disease of Swine, 11th ed. Wiley-Blackwell.

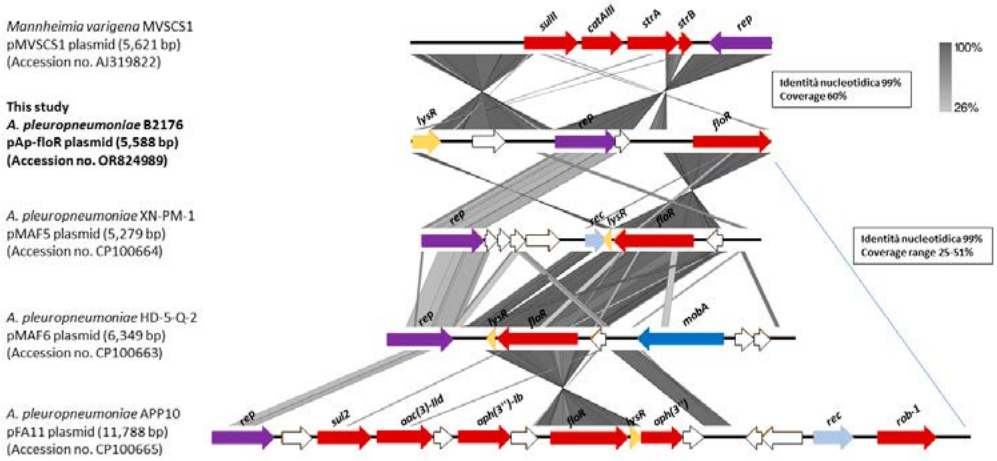


Figura 1. Mappa lineare del plasmide pAp-*floR* dei ceppi di *A. pleuropneumoniae* B2176 e B2177 confrontata, mediante Easyfig (https:// mjsull. github. io/ Easyfig/), sia con il plasmide pMVSCS1 di *M. varigena* che con tre plasmidi *floR* di *A. pleuropneumoniae*: (i) pMAF5 di *A. pleuropneumoniae* XN-PM-1; (ii) pMAF6 di *A. pleuropneumoniae* HD-5-Q-2; (iii) pFA11 di *A. pleuropneumoniae* APP10. Le posizioni e la direzione trascrizionale delle ORF sono rappresentate da frecce colorate. Vengono inoltre mostrati tutti i determinanti di resistenza agli antibiotici e alcuni geni rilevanti plasmidici.

Figure 1. Linear map of the pAp-*floR* plasmid of *A. pleuropneumoniae* strains B2176 and B2177 compared, using Ea-syfig (https:// mjsull. github. io/ Easyfig/), both with the pMVSCS1 plasmid of *M. varigena* and with three plasmids *floR* of *A. pleuropneumoniae*: (i) pMAF5 of *A. pleuropneumoniae* XN-PM-1; (ii) pMAF6 from *A. pleuropneumoniae* HD-5-Q-2; (iii) pFA11 of *A. pleuropneumoniae* APP10. The positions and transcriptional direction of the ORFs are represented by colored arrows. All antibiotic resistance determinants and relevant plasmid genes are also shown.

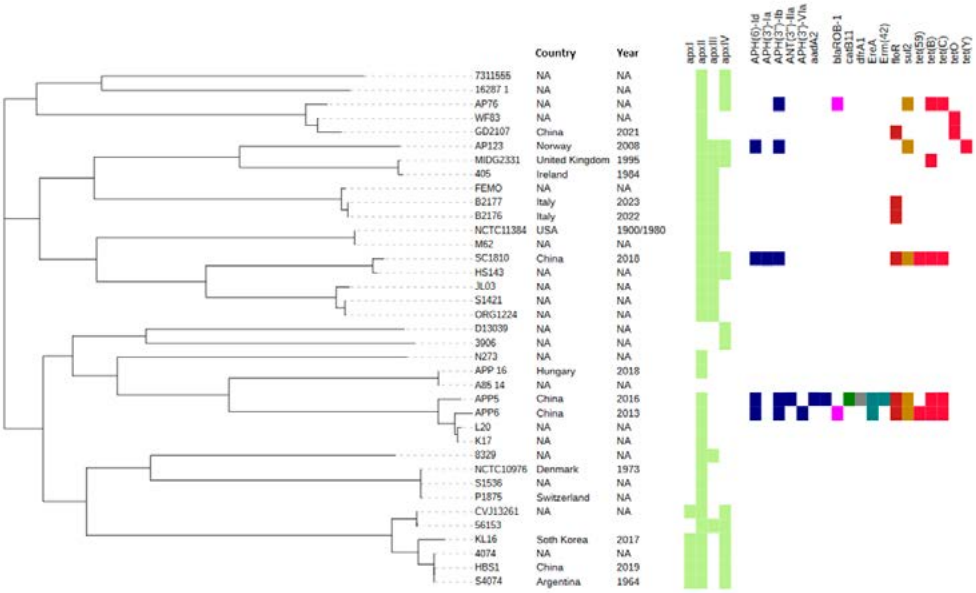


Figura 2. Albero filogenetico annotato utilizzando iTOL (https://itol.embl.de/). L'albero contiene i 37 isolati di *A. pleuropneumoniae* analizzati nel presente studio. La provenienza geografica, l'anno di isolamento, la presenza delle tossine Apx e dei geni di antibiotico resistenza di ciascun isolato sono rappresentati nell'albero.

Figure 2. Phylogenetic tree annotated using iTOL (https://itol.embl.de/). The tree contains the 37 isolates of *A. pleuropneumoniae* analyzed in the present study. The geographic origin, the year of isolation, Apx toxins and antibiotic resistant genes of each isolate are represented in the tree.

Tabella 1. Identità della sequenza di amminoacidi delle proteine putative codificate da pAp-*floR* (GenBank accession no.OR824989).
Table 1. Amino acid sequence identities of putative proteins encoded by the pAp-*floR* (GenBank accession no. OR824989).

ORF	Start (bp)	Size Stop (bp)	BLASTP analysis[a] (amino acids)	Predicted function	Most significant database match	Accession no.	% Amino acid identity (% amino acid similarity)
Δ*orf1*	28	459	143	Transcriptional regulator	LysR family transcriptional regulator [*Salmonella enterica*]	HCM0317119.1	100 (100)
orf2	964	1458	164		Hypothetical protein [*Pasteurella multocida*]	HDX1078716.1	99 (99)
orf3	2233	3201	322	Replication initiation protein	Replication initiation protein [*Mannheimia varigena*]	WP_011011116.1	100 (100)
orf4	3198	3413	71		Hypothetical protein [*Mannheimia varigena*]	WP_227991063.1	99 (98)
orf5	4374	5588	404	MFS transporter FloR	Chloramphenicol/florfenicol efflux MFS transporter FloR [*E. coli*]	WP_050008810.1	100 (100)

[a]For each ORF, only the most significant identity detected is listed.
Δtruncated ORFs

CONFRONTO DEI PROFILI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA E SENSIBILITÀ AI DISINFETTANTI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA ALLEVAMENTI SUINI DEL REGNO UNITO

ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILES AND BIOCIDE SUSCEPTIBILITY IN ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM PIG FARMS IN UK

BORTOLAMI L.[1,2], CAWTHRAW, S.[3], OSTANELLO F.[1], MARTELLI F.[3]

[1]Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy; [2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,, Padova, Italy; [3]Animal and Plant Health Agency (APHA) Bacteriology Department, UK

Parole chiave: antimicrobico-resistenza, disinfettanti, *E. coli*
Keywords: antimicrobial resistance, disinfectant, *E. coli*

Riassunto
La crescente minaccia dell'antimicrobico-resistenza (AMR) comporta una sempre maggior preoccupazione in campo medico, veterinario ed ambientale, portando all'esigenza di elaborare nuove e valide strategie per contrastare in maniera efficace le patologie causate da batteri. In questo contesto, corrette pratiche di biosicurezza unitamente ad un uso responsabile dei disinfettanti hanno guadagnato un ruolo cruciale nella lotta alle infezioni batteriche. In questo studio è stata verificata l'efficacia, espressa come valore di concentrazione minima inibente (MIC) e concentrazione minima battericida (MBC), di un disinfettante a base di Glutaraldeide e Composti di Ammonio Quaternario nei confronti di 19 ceppi di campo di *E. coli* isolati da allevamenti suinicoli del Regno Unito e di un ceppo di referenza (ATCC 25922). Sei ceppi di campo e il ceppo di referenza erano sensibili a tutte le 15 molecole di antimicrobico utilizzate (AMK, AMP, AZI, FOT, TAZ, CHL, CIP, COL, GEN, MERO, NAL, SMX, TET, TGC e TMP). Tredici ceppi erano resistenti ad un numero di molecole variabile da 2 a 11 (6 ceppi erano multi-resistenti, MDR). I risultati indicano che, *in vitro*, la concentrazione minima di disinfettante in grado di inibire efficacemente la replicazione dei ceppi AMR è significativamente superiore (p=0,039) a quella necessaria ad inibire i ceppi di *E. coli* non AMR. In maniera analoga, anche i valori di MIC dei ceppi MDR è superiore a quella dei ceppi non MDR. Tuttavia, in questo caso la differenza non è risultata essere statisticamente significativa (p=0,615).

Abstract
Antimicrobial-resistance (AMR) is a growing concern worldwide in the medical, veterinary and environmental fields, leading to the need of develop new and effective strategies to combat diseases caused by bacteria. In this context, adopting correct biosecurity practices along with responsible use of disinfectants on farm, have gained a crucial role in the fight against bacterial infections, including AMR bacteria. This study aimed to investigate the efficacy, expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values, of a disinfectant based on Glutaraldehyde and Quaternary Ammonium Compounds tested against 19 field strains of *E. coli* isolated from UK pig farms and one reference strain (ATCC 25922). Six field strains and the reference strain were susceptible to all 15 antimicrobial molecules used (AMK, AMP, AZI, FOT, TAZ, CHL, CIP, COL, GEN, MERO, NAL, SMX, TET, TGC and TMP). Thirteen strains were

resistant to a variable number of molecules ranging from 2 to 11 (6 multi-resistant strains, MDR). The results indicate that, *in vitro*, the minimum concentration of disinfectant that can effectively inhibit the replication of AMR strains is significantly higher (p=0.039) than that required to inhibit non-AMR *E. coli* strains. Similarly, the MIC values of MDR strains are higher than those of non-MDR strains. However, in this case the difference is not statistically significant (p=0.615).

INTRODUZIONE

L'antimicrobico-resistenza (AMR) è un fenomeno naturale che è stato amplificato dalla pressione selettiva esercitata dall'ampio utilizzo dei trattamenti antimicrobici in medicina umana e veterinaria. Negli ultimi decenni, l'AMR è aumentata rapidamente ed è ora considerata una delle principali emergenze sanitarie, in quanto si tratta di una grave minaccia per la salute e lo sviluppo globale (WHO, 2022; Montagnin et al. 2022).

Il termine "antimicrobico" viene usato per descrivere un ampio insieme di agenti chimici che vengono utilizzati, con varie modalità di applicazione, allo scopo di controllare la diffusione dei microrganismi. Gli antimicrobici possono essere suddivisi in due categorie principali: 1) biocidi antimicrobici, utilizzati in numerosi contesti, tra cui, ma non solo, antisettici, disinfettanti per superfici, conservanti per materiali e/o trattamenti di riciclo dell'acqua e 2) farmaci antimicrobici, quali ad esempio gli antibiotici, utilizzati per il trattamento delle infezioni umane e animali (ECHA, 2022; US EPA, 2022).

A causa dell'importanza degli antibiotici nella medicina moderna, l'emergere e la diffusione dell'AMR rappresenta un problema che desta crescente preoccupazione (CDC, 2019; Murray et al. 2022). Oltre ai farmaci antimicrobici, anche i biocidi sono inequivocabilmente importanti, in quanto ne viene fatto un uso diffuso attraverso alcuni prodotti per la casa, i conservanti alimentari, la produzione zootecnica, l'agricoltura e nei contesti clinici umani e veterinari, in cui svolgono un ruolo chiave nel controllo dei patogeni (Jones et al. 2021; Coombs et al. 2023).

Nelle produzioni animali, i biocidi vengono utilizzati principalmente per disinfettare locali e attrezzature o mezzi di trasporto degli animali. Il loro utilizzo appropriato, preceduto da una pulizia adeguata, è uno degli elementi chiave di una buona gestione dell'igiene nell'azienda zootecnica. Le pratiche di pulizia e disinfezione (*cleaning and disinfection*, C&D) sono importanti per ridurre la probabilità di introduzione in allevamento di agenti infettivi (biosicurezza esterna) e la loro diffusione (biosicurezza interna) (Maertens et al. 2020). Il loro corretto utilizzo può contribuire a ridurre la necessità di somministrazione di antimicrobici (Raasch et al. 2018).

Biocidi quali i composti di ammonio quaternario (QACs), gli agenti antisettici a base di cloro e i biguanidi sono largamente utilizzati nell'allevamento degli animali destinati alla produzione di alimenti (James et al. 2023).

La disinfezione ha lo scopo di ridurre o eliminare la carica batterica e virale (Van Immerseel et al. 2018); tuttavia è stato osservato che, in alcuni contesti, si rivela non completamente efficace, in quanto i microrganismi possono ancora essere presenti anche dopo la pulizia e la disinfezione delle strutture (Luyckx et al. 2014). Questa osservazione ha portato a ipotizzare che i batteri possano diventare resistenti ai disinfettanti utilizzati. Per questo motivo, in modo simile alla preoccupazione riguardante l'AMR, sono emersi timori riguardo alla possibilità che i batteri possano acquisire dei meccanismi per evadere gli effetti dei biocidi. Anche se è un fenomeno meno studiato rispetto all'AMR, la tolleranza di alcuni batteri ad un'ampia varietà di biocidi è già stata segnalata (Russel 2002; Maillard 2018).

Una delle cause della resistenza ai disinfettanti è correlata al fatto che il loro utilizzo in presenza di materiale organico o diluiti in acqua possa produrre forti riduzioni dell'efficacia, anche alle

concentrazioni di applicazione raccomandate; questo fenomeno ha come conseguenza il loro utilizzo a concentrazioni sub-inibitorie (Wales e Davies 2015; Maillard 2018).
E' stato osservato che basse concentrazioni ambientali di antimicrobici possono provocare lo sviluppo di resistenza nei ceppi batterici, conferendo loro un vantaggio competitivo, in quanto diventano potenzialmente in grado di replicare in tali ambienti più velocemente rispetto ai ceppi non resistenti (James et al. 2023).
La determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC) e/o della Concentrazione Minima Battericida (MBC) sono state ampiamente utilizzate per valutare la suscettibilità o la resistenza dei batteri agli antimicrobici, compresi i disinfettanti. Le popolazioni batteriche resistenti vengono selezionate a concentrazioni ambientali più elevate di disinfettante rispetto alla MIC dei batteri suscettibili (MICsusc). A concentrazioni di disinfettante inferiori al livello di MIC (sub-MIC), entrambi i genotipi suscettibili e resistenti possono sopravvivere e replicare (Khan et al. 2017).
Di conseguenza, la concentrazione selettiva minima (MSC), valutata sull'analisi dei tassi di replicazione, **è stata identificata come la concentrazione più bassa di antimicrobico che conferisce ai ceppi resistenti un vantaggio competitivo rispetto ai ceppi sensibili (Andersson e** Hughes 2014). Rappresenta, quindi, il punto in cui il beneficio nella crescita supera il costo (*fitness cost*) di possedere un gene di resistenza rispetto ad un ceppo non resistente (Gullberg et al. 2011), conferendo al ceppo batterico un vantaggio competitivo a concentrazioni superiori alla MSC (Sandegren 2014).
È quindi importante stabilire, per ogni antibiotico, quanto bassa sia la concentrazione in grado di selezionare i mutanti resistenti dei ceppi, ed indagarla tramite esperimenti di competizione. Per ogni antibiotico e per ogni microrganismo si possono definire tali concentrazioni in termini di una frazione della MIC, denominandola appunto MSC (Liu et al. 2011). Nello studio di Liu et al. (2011), ad esempio, la minima concentrazione selettiva (MSC) per *Escherichia coli*, isolato da microbioma umano, nei confronti di due antibiotici, si è rivelata nettamente inferiore al valore della MIC: 1/5 della MIC per ciprofloxacin e 1/20 della MIC per tetraciclina.
La valutazione della differenza tra organismi suscettibili e resistenti a valori sub-inibitori, potrebbe quindi portare alla definizione di valori di concentrazione battericida o inibente molto inferiori ai valori di MIC ufficiali per alcuni antimicrobici (Liu et al. 2011), in quanto i valori compresi tra la MSC e la MIC sono potenzialmente in grado di selezionare i batteri resistenti (Sandegren 2014). Tuttavia, come evidenziato dalla FAO/WHO nel 2019, ci sono scarse informazioni su quali dovrebbero essere questi valori soglia di MSC, importanti per definire dei valori standard adeguati per le concentrazioni di biocidi e metalli nella clinica veterinaria.
Oltre alla preoccupazione riguardante il potenziale aumento di tolleranza batterica ai biocidi, è emersa una seconda preoccupazione. A causa dell'utilizzo dei disinfettanti insieme agli antibiotici, sia in medicina umana che nell'allevamento degli animali, è stato ipotizzato che l'uso dei biocidi possa provocare una pressione selettiva che porta ad un fenomeno di cross-resistenza con gli antibiotici (Coombs et al. 2023).
Gli adattamenti di cross-resistenza possono essere normalmente presenti (intrinsechi) nei batteri, o facilmente acquisiti per mutazione o trasferimento genico in condizioni appropriate (Wales e Davies al. 2015; Donaghy et al. 2019).
Tali adattamenti includono la presenza di pompe di efflusso (proteine di trasporto coinvolte nell'espulsione di substrati tossici dall'interno delle cellule verso l'ambiente esterno (Webber e Piddock 2003)), formazione di biofilm, formazione di spore e ridotta permeabilità dell'involucro cellulare (James et al. 2023).
Si è ipotizzato, inoltre, che basse concentrazioni di antimicrobici in ambiente possano

aumentare il tasso di mutazioni casuali nelle popolazioni batteriche esposte, portando alla crescita di mutanti spontanei che mostrano una cross-resistenza a biocidi e antibiotici (Davies e Wales 2019).
La resistenza in molti batteri antimicrobico-resistenti (ARB) è codificata da geni presenti su grandi plasmidi coniugativi (Gulberg et al. 2014). Questi plasmidi tipicamente contengono molti geni di resistenza agli antibiotici (ARGs), oltre ai geni che conferiscono una ridotta suscettibilità/tolleranza ai biocidi (BRGs) e/o metalli (MRGs), e la possibilità di una correlazione genetica tra i due è già stata descritta (Galetti et al. 2021).
Tuttavia, sono stati evidenziati alcuni risultati contraddittori riguardo alla possibile associazione tra la ridotta suscettibilità ai disinfettanti e la resistenza agli antibiotici nei batteri presenti in campo (Fernández et al. 2018; Wieland et al. 2017).
Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato una riduzione della sensibilità ai disinfettanti dopo l'esposizione ripetuta dei batteri, inclusi ceppi di *Escherichia coli*, a concentrazioni sub-inibitorie di QACs (Soumet et al. 2016), di triclosan (Braoudaki e Hilton 2004), o a disinfettanti commerciali come, ad esempio, quelli a base di cloruro di benzalconio (BACs) (Nhung et al. 2015; Kim et al. 2018).
In particolare, Nhung et al. (2015) hanno osservato che l'esposizione di alcuni ceppi di *E. coli* (e di *Salmonella* non-tifoidea) a concentrazioni sub-inibitorie di un disinfettante commerciale comunemente usato, contenente una miscela di benzalconio cloride e glutaraldeide, impiegato in allevamenti suini e avicoli in Vietnam, sembrava co-selezionare la resistenza antimicrobica. Aumenti della MIC per il biocida erano fortemente correlati a ridotte suscettibilità evidenziate da incrementi della MIC per ampicillina, tetraciclina, ciprofloxacina, cloramfenicolo e, in misura minore, per gentamicina, trimetoprim/sulfametossazolo (Nhung et al. 2015).
Tuttavia, molte altre ricerche condotte *in vitro* riportano risultati opposti: negli studi di Karatzas et al. (2007) e Webber et al. (2015), con disinfettanti commerciali anziché componenti attivi, nessuno dei ceppi adattati ha mostrato una tolleranza aumentata dopo l'esposizione ai disinfettanti (Webber et al. 2015; Karatzas et al. 2007).
Altre ricerche in campo, tra cui quella *in vivo* condotta da Maertens et al. (2020), non hanno riscontrato variazioni di sensibilità nei ceppi di *E. coli* provenienti da allevamenti suinicoli a seguito dell'uso ripetuto di disinfettanti negli stabilimenti. Allo stesso modo, non è stata riscontrata una ridotta sensibilità agli antibiotici dopo l'uso di disinfettanti nelle unità di allevamento dei suinetti.
Ciò suggerisce che, mentre livelli sub-inibitori di disinfettanti possono influenzare la resistenza *in vitro*, il loro effetto potrebbe differire negli ambienti zootecnici (Maertens et al. 2020).
Sarebbero quindi necessari ulteriori studi per stabilire se i protocolli attuali di pulizia e disinfezione utilizzati negli allevamenti rappresentino un reale rischio per la selezione di fenomeni di antimicrobico-resistenza (AMR) e in quali modalità si esercitano.
L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare potenziali fenomeni di cross-resistenza in ceppi di *E. coli* isolati in allevamenti di suini del Regno Unito, che mostravano profili diversi di antimicrobico resistenza (AMR) e multi-resistenza (MDR).
In particolare è stata verificata la relazione tra la resistenza agli antibiotici, valutata tramite determinazione della MIC su un pannel di 15 molecole di antimicrobici, e i profili di resistenza ad un disinfettante utilizzato comunemente in zootecnia, a base di glutaraldeide e composti di ammonio quaternario (QAC), tramite determinazione della MIC e dell'MBC.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Il lavoro è stato condotto su 19 ceppi geneticamente distinti di *Escherichia coli*, isolati da

allevamenti suini del Regno Unito nel corso di ricerche precedenti, e conservati fino al momento della prova a -80°C presso il dipartimento di Batteriologia dell'Animal and Plant Health Agency (APHA, UK). E' stato inoltre utilizzato un ceppo di referenza (ATCC 25922).
I valori di MIC nei confronti di Amikacina (AMK), Ampicillina (AMP), Azitromicina (AZI), Cefotaxime (FOT), Ceftazidime (TAZ), Cloramfenicolo (CHL), Ciprofloxacina (CHP), Colistina, (COL), Gentamicina (GEN) Meropenem (MER), Acido nalidixico (NAL), Sulfametoxazolo (SMX), Tetraciclina (TET), Tigeciclina (TGC), Trimethoprim (TMP) sono stati determinati secondo le specifiche riportate dalla Decisione di Attuazione della Commissione 2013/652/UE. Per ciascuna molecola sono stati utilizzati i valori di breakpoint epidemiologici indicati dalla Decisione di esecuzione (UE) 2020/1729 ad eccezione dell'Azitromicina, per la quale sono stati utilizzati i valori di sensibilità o resistenza riportati nel documento M100 del CLSI (2021). Sei ceppi di campo e il ceppo di controllo sono risultati sensibili a tutte le 15 molecole di antimicrobico utilizzate. I rimanti 13 ceppi di *E. coli* utilizzati erano resistenti ad un numero di molecole variabile da 2 a 11. Sei ceppi sono stati classificati come multi-resistenti, ovvero resistenti a tre o più classi di antimicrobici (EFSA, 2021).
Preliminarmente, i ceppi sono stati seminati su piastre di CHROMagar™ ECC e successivamente incubati per una notte. Le colonie sono state poi trasferite nel terreno di mantenimento Dorset egg.

Disinfettante utilizzato
La sensibilità dei 20 ceppi batterici di *E. coli* utilizzati è stata valutata nei confronti di un prodotto disinfettante commerciale a base di Glutaraldeide e Composti di Ammonio Quaternario (QAC).
Il disinfettante scelto è efficace nei confronti di un ampio spettro di virus, batteri, funghi e micoplasmi. Si tratta di una formulazione attiva in presenza di materiale organico e non corrosiva nei confronti delle superfici, in quanto il pH si mantiene pari a 5.
Le soluzioni di disinfettante a diversa concentrazione sono state preparate appena prima di ogni esperimento e utilizzate entro tre ore. E' stata pesata una quantità di 1,03 g (equivalente a 1 mL) del prodotto a cui sono stati aggiunti 200 g di acqua dura per creare una soluzione di partenza alla diluizione 1:200. Successivamente, da questa soluzione base, sono state eseguite varie diluizioni per ottenere le concentrazioni desiderate del disinfettante (variabili da 1:400 fino a 1:32.000).

Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC)
La Concentrazione Minima Inibente (MIC) del disinfettante è stata determinata per tutti i venti ceppi di *E. coli*.
I valori di MIC degli isolati scelti sono stati ottenuti utilizzando il metodo della microdiluizione in brodo. Preliminarmente, alcune colonie batteriche sono state prelevate dal terreno di coltura e sono state sospese in acqua demineralizzata sterile (Thermo Scientific, Loughborough, Regno Unito).
Le caratteristiche di sensibilità alle diverse molecole e i profili di antimicrobico-resistenza sono riportati nella Tabella 1.
Le sospensioni batteriche sono state omogeneizzate tramite agitatore e la loro concentrazione è stata regolata utilizzando un nefelometro (Thermo Scientific, Loughborough, Regno Unito) in modo da ottenere una densità ottica (OD) di 0,5 unità di torbidità nefelometrica (NTU) sulla scala di McFarland.

Tabella 1. Caratteristiche di sensibilità alle diverse molecole e profili di antimicrobico-resistenza dei 20 ceppi di *E. coli* utilizzati.
Table 1. Sensitivity characteristics to different molecules and antimicrobial-resistance profiles of the 20 *E. coli strains* used.

Ceppo	AMK	AMP	AZI	FOT	TAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MER	NAL	SMX	TET	TGC	TMP	Profilo di antimicrobico-resistenza
LB1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	SMX-TET-TMP
LB2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
LB3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
LB4	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	AMP-CHL-GEN-SMX-TET-TMP
LB5	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	AMP-CHL-GEN-SMX-TET-TMP
LB6	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	AMP-CHL-CIP-SMX-TET-TMP
LB7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
LB8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
LB9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	SMX-TET-TMP
LB10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	SMX-TET-TMP
LB11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	SMX-TET-TMP
LB12	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	AMP-CHL-GEN-SMX-TET-TMP
LB13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	SMX-TMP
LB14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
LB15	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	CHL-GEN-SMX-TET-TMP
LB16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	TET-TMP
LB17	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	AMP-TMP
LB18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
LB19	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-COL-GEN-NAL-SMX-TET-TMP
ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

Successivamente, 20 µL della sospensione batterica sono stati diluiti in 11 mL di brodo Müller Hinton, ottenendo una concentrazione iniziale di circa 10^5 UFC/mL. Cento µL di ciascuna soluzione di disinfettante + acqua dura sono stati dispensati, in triplicato, nella

prima fila di una piastra microtiter a fondo rotondo da 96 pozzetti (Thermo Scientific Nunc, Loughborough, Regno Unito). Allo stesso tempo, 50 µL di acqua dura sono stati dispensati in tutti gli altri pozzetti. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 50 µL di inoculo batterico (approssimativamente 10^5 UFC/mL) utilizzando il Sistema di Distribuzione Automatica Thermo Scientific Sensititre AIM, ottenendo un volume finale di 100 µL (ulteriore diluizione del disinfettante 1:1) in ogni pozzetto.
Come controllo positivo, sono stati aggiunti 50 µL di sospensione batterica a 50 µL di Müller Hinton, senza alcun disinfettante.
In seguito, le piastre sono state incubate per 18-24 ore a 37°C. Dopo l'incubazione, la crescita batterica è stata valutata visivamente utilizzando lo strumento Sensititre Vizion (Thermo Scientific, Loughborough, Regno Unito), e il valore di MIC è stato definito come la concentrazione più bassa di disinfettante in cui non era presente alcun 'bottone' di crescita batterica osservabile.

Determinazione della Concentrazione Minima Battericida (MBC)
Anche la Concentrazione Minima Battericida (MBC) del disinfettante è stata determinata per tutti i venti i ceppi batterici.
Dieci µL della sospensione batterica presente nei pozzetti della piastra microtiter utilizzata per la diluizione del disinfettante, sono state utilizzati per la semina, in triplicato, su piastre di agar sangue ovino al 5% o piastre CHROMagar™ ECC. Dopo l'asciugatura, le piastre sono state incubate per 18-24 ore a 37°C e la crescita batterica è stata monitorata. La concentrazione più bassa di disinfettante che inibiva completamente la crescita batterica è stata registrata come valore di minima concentrazione battericida (MBC).

Analisi statistica
Preliminarmente, i valori di MIC e MBC sono stati calcolati come media geometrica dei valori ottenuti nelle diverse repliche eseguite. La stima della normalità della distribuzione campionaria dei valori di MIC e MBC è stata realizzata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. Sulla base dei risultati di questo test, eventuali differenze dei valori di MIC e MBC tra i ceppi di *E. coli* con profili di antibiotico-resistenza (AMR), multi-resistenza (MDR) e quelli pienamente sensibili, è stata realizzata utilizzato il test di U di Mann-Whitney. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS 28.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). La significatività statistica è stata fissata a valori di $p<0,05$.

RISULTATI
Nella Tabella 2 e nella Tabella 3 vengono riportate, rispettivamente, le medie geometriche dei valori di MIC e MBC del disinfettante esaminato dei due gruppi di *E. coli* a confronto: ceppi resistenti ad almeno una delle molecole antimicrobiche utilizzate (AMR si) verso ceppi pansensibili (AMR no) e ceppi multi-resistenti (MDR si) verso ceppi non multi-resistenti (MDR no).
Per quanto riguarda i valori di MIC del disinfettante (Tabella 2) è stata osservata una differenza statisticamente significativa ($p=0,039$): la concentrazione minima di disinfettante in grado di inibire efficacemente la replicazione dei ceppi AMR (diluizione 1:5101) è superiore a quella necessaria ad inibire i ceppi di *E. coli* non AMR (1:5805).
In maniera analoga, anche la MIC dei ceppi MDR (1:5358) è superiore a quella dei ceppi non MDR (1:5397). Tuttavia, in questo caso la differenza non risulta essere statisticamente significativa ($p=0,615$).

Tabella 2. Confronto delle medie geometriche dei valori di MIC tra ceppi di *E. coli* AMR o non AMR e MDR o non MDR
Table 2. Comparison of geometric means of MIC values between AMR or not-AMR and MDR or not-MDR *E. coli* strains

		Media geometrica valori di MIC	***p***
AMR	si	5101	0,039
	no	5805	
MDR	si	5358	0,615
	no	5397	

Per quanto riguarda i valori di MBC del disinfettante (Tabella 3) nessuna differenza statisticamente significativa (p>0,05) è stata osservata tra i diversi gruppi di ceppi di *E. coli* (AMR e non-AMR né tra i ceppi MDR e non-MDR).

Tabella 3. Confronto delle medie geometriche dei valori di MBC tra ceppi di *E. coli* AMR o non AMR e MDR o non MDR
Table 3. Comparison of geometric means of MBC values between AMR or not-AMR and MDR or not-MDR *E. coli* strains

		Media geometrica valori di MBC	***p***
AMR	si	4200	0.072
	no	5135	
MDR	si	4324	0.939
	no	4636	

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
Il presente studio ha avuto come obiettivo la valutazione diretta della capacità di tolleranza/sensibilità di alcuni ceppi di *E. coli* nei confronti di un disinfettante commerciale, normalmente utilizzato negli allevamenti suinicoli, contenente Glutaraldeide e Composti di Ammonio Quaternario (QAC) e la potenziale resistenza crociata nei confronti di 15 molecole di antibiotici.
Diciannove dei ceppi selezionati sono stati isolati in allevamenti suini del Regno Unito; di questi, 13 erano resistenti ad almeno una delle molecole di antibiotico esaminate (sei di questi ceppi sono stati classificati come multi-resistenti) mentre 6 ceppi (oltre al ceppo di controllo) erano pan-sensibili.
I diversi profili di antibiotico-resistenza e la presenza di ceppi MDR possono essere considerati sufficientemente rappresentativi della situazione normalmente presente negli allevamenti.
È stata quindi valutata l'eventuale differenza di efficacia *in vitro* del disinfettante (stimata attraverso i valori di MIC e MBC) per i ceppi di *E. coli* che presentavano profili di antibiotico-resistenza (AMR), multi-resistenza (MDR) o completa sensibilità.
Dai risultati ottenuti si osserva che la minima concentrazione inibente (MIC) di disinfettante necessaria per rallentare la crescita dei ceppi di *E. coli* resistenti ad almeno uno degli

antibiotici esaminati, è significativamente maggiore rispetto alla concentrazione necessaria per inibire la crescita dei ceppi sensibili a tutte le molecole antibiotiche. In altri termini, i ceppi antibiotico-resistenti (AMR) presentavano una maggiore tolleranza al disinfettante utilizzato rispetto a quelli non AMR. Questo risultato è stato osservato anche tra i ceppi multi-resistenti (MDR) rispetto a quelli non-MDR, ma in assenza di una differenza statisticamente significativa. Queste differenze di sensibilità al disinfettante potrebbero essere attribuite all'esistenza di meccanismi di resistenza crociati che permettono ai batteri di sviluppare caratteri in grado di aumentare la tolleranza nei confronti sia dei disinfettanti che degli antibiotici.
Come viene descritto da Coombs et al. (2023), i batteri, per aumentare la loro tolleranza ai biocidi, ricorrono ad una serie di meccanismi che presentano delle analogie con quelli della resistenza agli antibiotici. Tuttavia, mentre i batteri sono in grado di eludere l'effetto degli antibiotici tramite cambiamenti relativamente piccoli del bersaglio dei farmaci, come ad esempio una mutazione nel sito di legame, non possono utilizzare gli stessi stratagemmi per eludere i biocidi, prodotti che utilizzano contemporaneamente meccanismi differenti per uccidere i microrganismi.
Deve essere considerato che, in letteratura sono presenti risultati controversi riguardo alla possibile associazione tra la ridotta suscettibilità dei batteri ai disinfettanti e la resistenza agli antibiotici e i meccanismi alla base della resistenza crociata rimangono per la maggior parte sconosciuti o poco chiari (Fernández et al. 2018; Wieland et al. 2017).
Tuttavia, la modifica della capacità dei batteri di consentire l'ingresso dei biocidi nella cellula, ad esempio tramite una riduzione nell'entrata grazie alle porine o un aumento della fuoriuscita grazie alle pompe di efflusso, potrebbe essere la causa di una resistenza crociata con gli antibiotici (Coombs et al. 2023).
Il meccanismo più comunemente descritto e proposto come base della cross-resistenza è l'*up-regulation* dell'espressione genica delle pompe di efflusso o il loro aumento di attività (Gadea et al. 2017; Pereira et al. 2021; Amsalu et al. 2020). Infatti, negli studi in cui le pompe di efflusso sono state inibite, i batteri tolleranti ed adattati al disinfettante, sembrano riacquistare, almeno in parte, la suscettibilità al biocida stesso (Nhung et al. 2015).
La loro regolazione, quindi, è uno dei principali meccanismi che utilizzano i batteri per eludere l'azione di antimicrobici nell'ambiente, ma non è l'unico descritto. Pereira et al. (2021), hanno valutato la capacità di resistenza ai biocidi di ceppi di *E. coli* AMR, evidenziando che le mutazioni genetiche associate allo sviluppo di cross-resistenza erano, in particolare, quelle relative alle pompe di efflusso multidrug (mdfA e acrR), alle porine (envZ e ompR) e alla RNA polimerasi (rpoA e rpoBC).
Anche nella revisione della letteratura realizzata da Coombs et al. (2023) riguardante i potenziali legami di cross-resistenza tra antibiotici e biocidi, sono stati identificati i geni di efflusso primariamente coinvolti nella capacità di conferire resistenza crociata ai batteri; questi geni includono AcrAB, CmeABC, EmrE, MdeA, MdfA(Cmr/CmlA), MepA, MexAB, MexCD, MexEF, NorA, NorB, QacABE e QacEΔ1 (Kampf et al. 2018; Pole 2007).
I risultati disponibili necessitano quindi di conferme ed ulteriori approfondimenti. Questo è dovuto anche al fatto che la mancanza di breakpoint ufficiali per i biocidi impediscono di categorizzare i ceppi batterici in sensibili, intermedi e resistenti, come avviene nei confronti delle molecole antibiotiche. È importante infatti sottolineare che, a differenza della resistenza agli antibiotici, per cui esistono metodi e definizioni standardizzati per misurare e definire l'efficacia rispetto all'uso terapeutico clinico, attualmente non esistono delle stesse metodiche per qualificare o quantificare l'efficacia dei biocidi (Coombs et al. 2023).
Nonostante la MIC possa essere determinata anche per i biocidi, i valori individuati non possono essere utilizzati per stabilire le concentrazioni di disinfettante da utilizzare nella pratica. Infatti, a differenza degli antibiotici, lo scopo dei biocidi è quello di uccidere rapidamente i batteri presenti nell'ambiente, non solamente di inibire la loro crescita; di conseguenza, basare la valutazione

di efficacia dei disinfettanti sui valori di MIC può essere fuorviante. L'efficacia dei biocidi viene, ad ora, valutata con procedure "time-kill" o con la determinazione della concentrazione che produce una determinata riduzione logaritmica del numero di microrganismi presenti nell'ambiente (EN 14885:2023). In medicina veterinaria questa procedura viene descritta dalla ISO EN 1656:2019, che permette la valutazione dell'attività battericida di disinfettanti chimici e prodotti antisettici. Tuttavia, il vantaggio di utilizzare un metodo di valutazione della MIC o della MBC nei confronti del disinfettante che preveda l'utilizzo di batteri in sospensione, è che le procedure sono facilmente standardizzabili e i risultati ottenuti sono ripetibili e comparabili (Montagnin et al. 2022).

Poter valutare facilmente l'efficacia dei disinfettati utilizzati nelle procedure di pulizia e disinfezione (C&D) è infatti di cruciale importanza, in quanto questi prodotti sono primariamente coinvolti nelle misure di biosicurezza degli allevamenti, permettendo una prevenzione ed un controllo della trasmissione delle infezioni negli animali (Maertens et al. 2019). Se i biocidi utilizzati non garantiscono un'adeguata disinfezione degli ambienti, si potrebbe osservare una diminuzione della sensibilità dei batteri nei loro confronti. E' possibile ipotizzare alcuni motivi per spiegare questo fenomeno: la presenza nell'ambiente di concentrazioni residuali del disinfettante, l'utilizzo di concentrazioni non adeguate, brevi tempi di contatto o il loro utilizzo non corretto dovuto a notevole presenza di materiale organico per una scorretta procedura di pulizia e lavaggio (Russel et al. 2003).

I risultati ottenuti da prove di valutazione dell'efficacia inibitoria o battericida dei disinfettanti, nonostante siano ripetibili e facilmente comparabili, devono tuttavia essere valutati con cautela, in quanto si riferiscono a condizioni *in vitro*, spesso molto diverse da quelle che si riscontano negli ambiti di utilizzo reali. In condizioni di campo sono presenti diverse variabili, come la presenza di materiale organico, il tipo di materiale delle superfici trattate e la presenza di crepe, la temperatura ambientale, la capacità batterica di formazione di biofilm, che possono esercitare un impatto negativo sulla capacità batteriostatica o battericida dei disinfettanti (Maertens et al. 2019; Montagnin et al. 2022). Sarebbe quindi auspicabile una valutazione più approfondita, che preveda l'aggiunta di matrici organiche alla sospensione batterica, come previsto dalla ISO 1656:2019, quali albumina di siero bovino (BSA) o estratto di lievito, per verificare possibili variazioni nella MIC del disinfettante.

Questi risultati, nonostante i limiti sopra descritti, confermano che per ottenere un'efficace pulizia e disinfezione negli allevamenti è necessario adottare un protocollo rigoroso, tenendo in considerazione soprattutto la popolazione ambientale batterica già presente nell'allevamento, con le eventuali relative resistenze agli antibiotici. L'adozione di tali precauzioni potrebbe garantire un'efficacia appropriata della disinfezione, senza contribuire ad un possibile aumento delle cross-resistenze.

Va inoltre considerato che, se si accetta l'ipotesi di una correlazione tra AMR e ridotta sensibilità ai disinfettanti, l'uso prudente e razionale del farmaco in allevamento potrebbe contribuire a limitare questo fenomeno.

BIBLIOGRAFIA

1. Amsalu, A., Sapula, S. A., Lopes, M. D. B., Hart, B. J., Nguyen, A. H., Drigo, B., Turnidge, J., Leong, L. E. X., & Venter, H. (2020). Efflux pump-driven antibiotic and biocide cross-resistance in pseudomonas Aeruginosa isolated from different ecological Niches: A case study in the development of multidrug resistance in environmental hotspots. *Microorganisms*, *8*(11), 1–18. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111647
2. Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(7), 465–478. https://doi.org/10.1038/nrmicro3270

3. Braoudaki, M., & Hilton, A. C. (2004). Adaptive Resistance to Biocides in Salmonella enterica and Escherichia coli O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(1), 73–78. https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.73-78.2004
4. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States; Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2019. Available online: https://www.cdc.gov/drugresistance/Biggest-Threats.html
5. Coombs, K., Rodriguez-Quijada, C., Clevenger, J. O., & Sauer-Budge, A. F. (2023). Current Understanding of Potential Linkages between Biocide Tolerance and Antibiotic Cross-Resistance. *Microorganisms*, *11*(8). https://doi.org/10.3390/microorganisms11082000
6. Davies, R., & Wales, A. (2019). Antimicrobial Resistance on Farms: A Review Including Biosecurity and the Potential Role of Disinfectants in Resistance Selection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(3), 753–774. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12438
7. Donaghy, J. A., Jagadeesan, B., Goodburn, K., Grunwald, L., Jensen, O. N., Jespers, A., Kanagachandran, K., Lafforgue, H., Seefelder, W., & Quentin, M. C. (2019). Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection*, *82*(5), 889–902. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373
8. EFSA; ECDC. (2021). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal*, *19*(4). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490
9. EN 14885:2023; Chemical Disinfectants and Antiseptics—Application of European Standards for Chemical Disinfectants and Antiseptics. Marzo, 2023.
10. EN 1656:2019; Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area - Test method and requirements (phase 2, step 1). November, 2019.
11. European Chemicals Agency (ECHA). Biocidal Products Regulation (BPR) Annex V Product Types. Available online: https://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation/understanding-bpr
12. Fernández Márquez, M. L., Grande Burgos, M. J., Pulido, R. P., Gálvez, A., & Lucas López, R. (2018). Correlations among Resistances to Different Antimicrobial Compounds in Salmonella Strains from Hen Eggshells. *Journal of Food Protection*, *81*(2), 178–185. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-200
13. Food and Agriculture Organization, & World Health Organization. (2019). Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides – Meeting report. In *Microbiological Risk Assessment Series no. 34*. https://www.who.int/publications/i/item/9789241516907
14. Gadea, R., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Ortega, E. (2017). Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology*, *63*, 58–71. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.037
15. Galetti, R., Filho, R. A. C. P., Ferreira, J. C., Varani, A. M., Sazinas, P., Jelsbak, L., & Darini, A. L. C. (2021). The plasmidome of multidrug-resistant emergent Salmonella serovars isolated from poultry. *Infection, Genetics and Evolution*, *89*(January), 104716. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104716
16. Gullberg, E., Albrecht, L. M., Karlsson, C., Sandegren, L., & Andersson, D. I. (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio*, *5*(5). https://doi.org/10.1128/mBio.01918-14
17. Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS*

Pathogens, *7*(7), 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158
18. James, C., James, S. J., Onarinde, B. A., Dixon, R. A., & Williams, N. (2023). A Critical Review of AMR Risks Arising as a Consequence of Using Biocides and Certain Metals in Food Animal Production. *Antibiotics*, *12*(11), 1569. https://doi.org/10.3390/antibiotics12111569
19. Jones, I. A., & Joshi, L. T. (2021). Biocide use in the antimicrobial era: A review. *Molecules*, *26*(8). https://doi.org/10.3390/molecules26082276
20. Kampf, G. (2018). Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in gram-negative species. *Antibiotics*, *7*(4). https://doi.org/10.3390/antibiotics7040110
21. Karatzas, K. A. G., Webber, M. A., Jorgensen, F., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V., & Humphrey, T. J. (2007). Prolonged treatment of Salmonella enterica serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*(5), 947–955. https://doi.org/10.1093/jac/dkm314
22. Khan, S., Beattie, T. K., & Knapp, C. W. (2017). The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology*, *26*(2), 283–292. https://doi.org/10.1007/s10646-017-1762-y
23. Kim M, Weigand MR, Oh S, Hatt JK, Krishnan R, Tezel U, Pavlostathis SG, Konstantinidis KT. (2018). Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 84:e01201-18. https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01201-18
24. Liu, A., Fong, A., Becket, E., Yuan, J., Tamae, C., Medrano, L., Maiz, M., Wahba, C., Lee, C., Lee, K., Tran, K. P., Yang, H., Hoffman, R. M., Salih, A., & Miller, J. H. (2011). Selective advantage of resistant strains at trace levels of antibiotics: A simple and ultrasensitive color test for detection of antibiotics and genotoxic agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(3), 1204–1210. https://doi.org/10.1128/AAC.01182-10
25. 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 non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. *Poultry Science*, *94*(4), 740–749. https://doi.org/10.3382/ps/pev019
26. Maertens, H., De Reu, K., Meyer, E., Van Coillie, E., & Dewulf, J. (2019). Limited association between disinfectant use and either antibiotic or disinfectant susceptibility of Escherichia coli in both poultry and pig husbandry. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12917-019-2044-0
27. Maertens, H., Van Coillie, E., Millet, S., Van Weyenberg, S., Sleeckx, N., Meyer, E., Zoons, J., Dewulf, J., & De Reu, K. (2020). Repeated disinfectant use in broiler houses and pig nursery units does not affect disinfectant and antibiotic susceptibility in Escherichia coli field isolates. *BMC Veterinary Research*, *16*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02342-2
28. Maillard J-Y. (2018). Resistance of bacteria to biocides. *Microbiology Spectrum*, 6(2):ARBA-0006-2017. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0006-2017
29. Montagnin, C., Cawthraw, S., Ring, I., Ostanello, F., Smith, R. P., Davies, R., & Martelli, F. (2022). Efficacy of Five Disinfectant Products Commonly Used in Pig Herds against a Panel of Bacteria Sensitive and Resistant to Selected Antimicrobials. *Animals*, *12*(20). https://doi.org/10.3390/ani12202780
30. Murray, C. J. and Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0
31. Nhung, N. T., Thuy, C. T., Trung, N. V., Campbell, J., Baker, S., Thwaites, G., Hoa, N. T.,

& Carrique-Mas, J. (2015). Induction of antimicrobial resistance in Escherichia coli and non-typhoidal salmonella strains after adaptation to disinfectant commonly used on farms in Vietnam. *Antibiotics*, *4*(4), 480–494. https://doi.org/10.3390/antibiotics4040480

32. Pereira, M.P., Wang, X., & Tagkopoulos, I. (2021). Biocide-Induced Emergence of Antibiotic Resistance in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, *12*(February), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640923
33. Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, *39*(3), 162–176. https://doi.org/10.1080/07853890701195262
34. Raasch, S., Postma, M., Dewulf, J., Stärk, K. D. C., & grosse Beilage, E. (2018). Association between antimicrobial usage, biosecurity measures as well as farm performance in German farrow-to-finish farms. *Porcine Health Management*, *4*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s40813-018-0106-5
35. Russell, A. D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, *92*(1), 121–135. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x
36. Russell, A. D. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infectious Diseases*, *3*(12), 794–803. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00833-8
37. Sandegren, L. (2014). Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *119*(2), 103–107. https://doi.org/10.3109/03009734.2014.904457
38. Soumet, C., Méheust, D., Pissavin, C., Le Grandois, P., Frémaux, B., Feurer, C., Le Roux, A., Denis, M., & Maris, P. (2016). Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(5), 1275–1281. https://doi.org/10.1111/jam.13247
39. United States Environmental Protection Agency (EPA). What Are Antimicrobial Pesticides? Available online: https://www.epa.gov/pesticide-registration/what-are-antimicrobial-pesticides
40. Van Immerseel F, Luyckx K, De Reu K, Dewulf J. (2018). Cleaning and disinfection. In: Dewulf J, Van Immerseel F, editors. Biosecurity in animal production and Veterinary medicine. First edit. Acco; 2018. https://doi.org/10.1079/9781789245684.0133
41. Wales, A. D., & Davies, R. H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, *4*(4), 567–604. https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567
42. Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(1), 9–11. https://doi.org/10.1093/jac/dkg050
43. Webber, M. A., Whitehead, R. N., Mount, M., Loman, N. J., Pallen, M. J., & Piddock, L. J. V. (2015). Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(8), 2241–2248. https://doi.org/10.1093/jac/dkv109
44. WHO (2022). Antibiotic resistance. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance
45. Wieland, N., Boss, J., Lettmann, S., Fritz, B., Schwaiger, K., Bauer, J., & Hölzel, C. S. (2017). Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and -susceptible isolates of Escherichia coli, Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from poultry–ESBL/AmpC-phenotype of E. coli is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. *Journal of Applied Microbiology*, *122*(6), 1508–1517. https://doi.org/10.1111/jam.13440

VIRUS INFLUENZALI SUINI NEL NORD ITALIA. STUDIO DELLE FORME EPIZOOTICHE ED ENZOOTICHE NEGLI ALLEVAMENTI

SWINE INFLUENZA VIRUSES IN NORTHERN ITALY. STUDY OF EPIZOOTIC AND ENZOOTIC FORMS IN FARMS

CHIAPPONI C., PROSPERI A., SOLIANI L., BAIONI L., ZANNI I., CALANCHI I., MESCOLI A., TORREGGIANI C., MORENO A., ALBORALI L., FACCINI S., ROSIGNOLI C., BONILAURI P., PUPILLO G., FIORENTINI L., TOSI G., LUPPI A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: influenza A virus, suini, variabilità genetica, PRDC.
Keywords: Influenza A virus, swine, genetic variability, PRDC

Riassunto
Lo studio ha avuto come obiettivo il monitoraggio della circolazione dei virus influenzali e delle co-infezioni virali e batteriche negli allevamenti suini del Nord Italia, utilizzando un campionamento attivo e passivo in casi di sindrome respiratoria suina (PRDC). Si è evidenziata una significativa presenza di virus influenzali con una rilevante circolazione dei sottotipi H1N1 e H1N2, associata a PRRSv, indipendentemente dalla tipologia di campionamento (attivo o passivo) ed inoltre, è emersa la presenza di nuovi virus respiratori, come *Swine Orthopneumovirus* e *Porcine Respirovirus*. Nei casi di PRDC l'istopatologia ha dimostrato un ruolo discriminante e di conferma nella diagnosi della PRDC, mentre la sierologia, con l'impiego di test ELISA e HI, ha evidenziato la necessità di adattare le metodiche di *screening* ai sottotipi influenzali e di abbandonare l'uso di test non corrispondenti ai ceppi circolanti. Infine, l'analisi filogenetica ha rivelato una alta variabilità dei virus influenzali e ha evidenziato l'importanza del sequenziamento per l'importanza delle informazioni epidemiologiche che ne derivano. Questi risultati sottolineano l'importanza di un costante monitoraggio della circolazione virale e batterica e la necessità di adeguare le metodiche diagnostiche per affrontare la circolazione attiva e la diversificazione virale presenti nei suini del Nord Italia.

Abstract
The study aimed to monitor the influenza viruses' circulation and viral and bacterial co-infections in pig farms in Northern Italy, using active and passive sampling from cases of porcine respiratory syndrome (PRDC). The results highlighted a significant presence of influenza viruses with a significant circulation of the H1N1 and H1N2 subtypes, associated with PRRSv, both in active and passive samples and furthermore, the presence of new respiratory viruses emerged, such as *Swine Orthopneumovirus* and *Porcine Respirovirus*. Histopathology showed a discriminating role in the diagnosis of porcine respiratory infections, while serology, with the use of ELISA and HI tests, highlighted the need to adapt screening methods for influenza subtypes and to abandon the use of tests that do not correspond to circulating strains. Finally, phylogenetic analysis revealed a high variability of influenza viruses and highlighted the importance of genomic sequencing for the epidemiological information. These results underline the importance of constant monitoring of viral and bacterial circulation and of adapting diagnostic methods to address active circulation and viral diversification in pigs in Northern Italy.

INTRODUZIONE

La produzione di suini è cresciuta enormemente in tutto il mondo negli ultimi 20 anni, portando ad una modificazione strutturale degli allevamenti di questo settore. Nel frattempo, la dinamica delle infezioni da virus dell'influenza A suina (swIAV) è cambiata, da forma epizootica acuta respiratoria a enzootica con circolazione ricorrente in numerose aziende. Fra i suini a livello globale, i sottotipi endemici circolanti sono H1N1, H1N2 e H3N2. Tuttavia, la diversità genetica fra questi sottotipi è enorme. Infatti, la variabilità genetica e antigenica degli swIAV nei suini europei (H1N1, H1N2, H3N2 e H1N1pdm09) è aumentata notevolmente negli ultimi anni, con la produzione di ceppi riassortanti e varianti antigeniche che pongono un interrogativo sull'efficacia dei vaccini in uso (Simon et al. 2014; Watson et al. 2015). Attualmente, sul territorio europeo e italiano i sottotipi influenzali circolanti fra i suini appartengono a diversi lineaggi genetici dinamicamente mutevoli nel tempo (Henritzi et al. 2020; Chiapponi, Chiara et al. 2021). La complessa categorizzazione dei sottotipi ne prevede la classificazione sulla base delle combinazioni dei geni codificanti per emoagglutinina e neuroaminidasi. Recentemente, le emoagglutinine di tipo H1 suine sono state suddivise in lineaggi genetici (H1A o pandemico, H1B o human-like e H1C o avian-like) a livello globale (Anderson, T. K. et al. 2016) che a loro volta sono distinguibili in numerosi sottogruppi (sub-clade). La variabilità genetica di questi virus sarebbe dovuta a ripetute infezioni uomo-animale/animale-uomo in entrambe le direzioni, con conseguente adattamento ed evoluzione ospite-dipendente (Nelson et al. 2015; Anderson, Tavis K. et al. 2021)

In Italia è stata descritta la variabilità dei ceppi circolanti che vede la presenza di emoagglutinine H1 di tipo H1-1A o pandemico (pdm), H1-1B o human-like (hu-like), H1-1C o avian-like (av-like) (Chiapponi, C. et al. 2021) e relativi sotto-clade, identificati tramite indici numerici, in combinazione con geni per neuroaminidasi di tipo N1 (av-like o pdm) e di tipo N2. La circolazione di swIAV nella popolazione suina incide negativamente sulla salute e sul benessere degli animali, inoltre influenza l'utilizzo di antibiotici in quanto frequentemente funge da agente primario, in grado di predisporre l'ospite a infezioni secondarie batteriche da parte di altri agenti patogeni respiratori, nell'insorgenza del complesso della malattia respiratoria suina (PRDC) (Saade et al. 2020). Inoltre, l'esposizione continua degli esseri umani agli swIAV negli allevamenti, rappresenta un rischio per la salute pubblica (Anderson, Tavis K. et al. 2021). La conoscenza dei fattori di rischio che favoriscono la comparsa di infezioni ricorrenti da swIAV negli allevamenti è tutt'ora frammentaria e, come conseguenza, non vengono approntate adeguate misure di controllo per la prevenzione e gestione della PRDC.

In questo studio abbiamo monitorato la circolazione dei virus influenzali e co-infezioni virali e batteriche negli allevamenti suini del Nord Italia. Lo studio ha previsto un monitoraggio passivo di campioni suini da casi di PRDC e un monitoraggio attivo in aziende del territorio, in assenza di focolai di malattia respiratoria.

MATERIALI E METODI

Campionamento attivo. Sono state arruolate 32 aziende suine, che recentemente avevano presentato positività per influenza A virus (IAV) a seguito di conferimenti diagnostici presso IZSLER. Gli animali appartenenti a queste aziende sono stati sottoposti ad un campionamento attivo, nei mesi autunnali/invernali, tramite fluidi orali (1 per gruppo) o tamponi nasali (circa 10 per gruppo animale), anche in assenza di forme respiratorie acute, grazie alla collaborazione dei veterinari aziendali. I campioni prelevati, sono stati testati in PCR per IAV, PRRSv e PRCV (porcine respiratory coronavirus). In due aziende è stato possibile prelevare sangue da 30 animali appartenenti a gruppi in cui due settimane prima era stata rilevata circolazione di virus influenzale.

Test sierologici. In due aziende campionate attivamente sono stati testati i sieri convalescenti, prelevati dal gruppo di animali con dimostrata circolazione virale circa due settimane prima del prelievo, esaminati con test ELISA anti nucleoproteina e con test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI), utilizzando ceppi caratterizzati e utilizzati routinariamente e i ceppi stessi isolati dalle aziende (Ceppi omologhi) (WOAH. 2023).
Campionamento passivo. È stato eseguito uno screening molecolare per influenza su campioni conferiti a scopo diagnostico per PRDC (parenchima polmonare, tamponi nasali, fluidi orali) presso l'IZSLER fra il 2021 e il 2023. Una selezione di questi, visceri/polmoni, prelevati da animali con forma respiratoria, è stata sottoposta ad analisi batteriologiche e biomolecolari (PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSv, PCV2, PRCV e IAV) per verificare l'eziologia del caso. I tamponi nasali prelevati in corso di infezione respiratoria sono stati esaminati per le ricerche di IAV, PRRS e PRCV con le tecniche molecolari. Inoltre, una selezione di campioni, provenienti da campionamento passivo, è stata sottoposta ad indagine molecolare per la ricerca di due nuovi virus respiratori, descritti recentemente, con ipotizzabile coinvolgimento nelle forma da PRDC, ovvero *Swine Orthopneumovirus* (SOV) e Porcine Respirovirus 1 (PRV1) (Graaf-Rau et al. 2023).
Indagine istopatologica
Una selezione di polmoni, conferiti da casi di PRDC, è stata sottoposta ad analisi istologica. I campioni 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.
Caratterizzazione virus influenzali da campionamento passivo e attivo. I campioni risultati positivi a IAV con test molecolari in RT-PCR sono stati sottoposti a tipizzazione molecolare per definire il lineaggio di HA (H1A, H1B, H1C, H3) e di NA (N1 o N2) virale presente e ad isolamento virale su colture cellulari o uova embrionate. L'indagine molecolare è stata estesa a tutti i campioni risultati positivi per IAV e sottomessi ai test diagnostici (anche se non tutti analizzati per il pannello di prove previste dalla ricerca) presso IZSLER per aumentare il numero di sequenze analizzate nel corso del periodo. Le sequenze virali provenienti da sorveglianza passiva e attiva del periodo oggetto di studio, 2021-2023, sono state ottenute tramite NGS e analizzate filogeneticamente insieme a quelle di virus caratterizzati recentemente a partire dal 2009 (Chiapponi, C. et al. 2021) ed i geni per HA sono stati ulteriormente caratterizzati nei sub-clade tramite nomenclatura internazionale come H1A3.3.2, H1C.2.1, H1C.2.2, H1C.2.4, H1C.2.5, H1B1.2.1, H1B1.2.2, H3[84], H3[2010] (Anderson, Tavis K. et al. 2021) .

RISULTATI

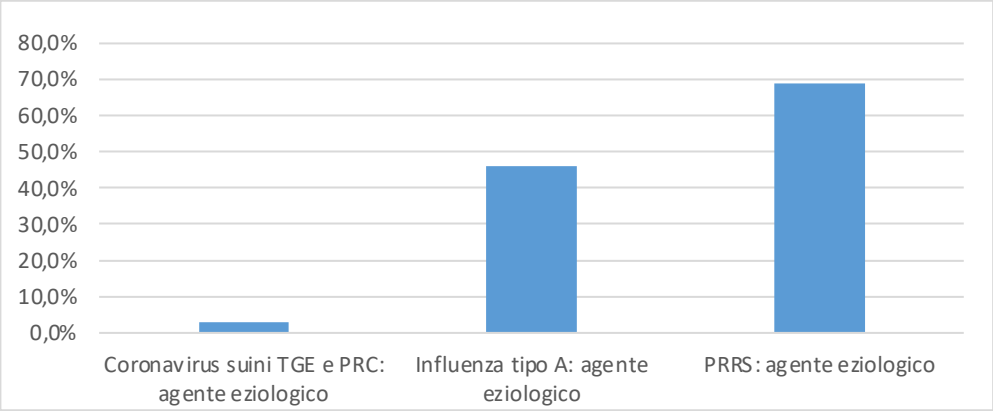
Campionamento passivo.
Nel corso dello studio, negli anni 2021-2023, è stato eseguito uno screening molecolare per influenza su 2547 campioni pervenuti per scopo diagnostico presso IZSLER. Una selezione di 303 campioni (Visceri/polmoni o tamponi nasali), prelevati da animali con forma respiratoria, è stata sottoposta ad analisi batteriologiche e biomolecolari per identificare l'eziologia del caso, per un totale di 253 conferimenti provenienti da 180 aziende, suddivisi in 100 conferimenti di tamponi nasali e 153 casi da polmone. Sui tamponi sono stati eseguiti almeno in parallelo ricerca di PRRSv e IAV e sui polmoni sono stati eseguiti anche gli esami batteriologici e le ricerche molecolari per *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV2, Porcine respiratory coronavirus (PRC).
I campioni positivi per influenza sono risultati essere il 33% fra i tamponi e il 9,7% fra i polmoni (Tabella 1), provenienti da 53 aziende con circolazione di virus influenzale.

	Coronavirus suini TGE e PRC	Influenza tipo A	Mycoplasma hyopneumoniae	PRRS	Circovirus PCV2
TAMPONI %	25,8	33,2	NV	32,4	NV
POLMONI %	0	9,7	28,9	57,2	40

Tabella 1. Positività in percentuale riscontrata fra i campioni analizzati nell'ambito del monitoraggio passivo di forme respiratorie. NV non valutato (n. 100 tamponi; n. 153 conferimenti di polmoni).
Table 1. Positivity rate found among the analyzed samples as part of the passive monitoring of respiratory forms. NV not evaluated (n. 100 swabs; n. 153 lungs).

PRRSv è stato l'agente virale riscontrato più frequentemente a livello polmonare (57%), seguito da PCV2 (40%) e da *M. hyopneumoniae* (29%); PRCV non è mai stato rilevato nei casi analizzati. Dai tamponi nasali, invece, i tre agenti virali ricercati si sono ritrovati con percentuali simili: IAV 33%, PRRSv 32% e PRCV 26%. Fra i polmoni positivi a PCV2 il 68% dei campioni presentava un valore di copie di genoma virale/g di campione > 10^6.
Analizzando le co-infezioni rilevate in polmoni risultati positivi per IAV si è evidenziato che nel 33% dei casi era presente *Pasteurella multocida*, ed in percentuali significative PRRS (47%), *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 (circa 40%). Solo in 2 casi su 21 IAV è stato rilevato come unica positività fra gli agenti virali e batterici testati (Sottotipo H1CN2 e sottotipo non tipizzabile). Per quanto riguarda i tamponi, su cui è stato considerato solo il pannello di analisi molecolare, fra i 55 casi di positività per IAV, nel 34% dei casi sono stati rilevati anche PRRSv e nel 20% PRC.
L'indagine per PRV1 e SOV si è realizzata su campioni (tamponi nasali e polmoni) raccolti da 207 aziende italiane monitorate passivamente, fra agosto 2022 e settembre 2023. La positività per PRV1 è risultata essere pari a 11,6% mentre quella a SOV del 6,8%. Nel 3,4% i due virus co-circolavano contemporaneamente.
Indagine istopatologica
In 18 focolai, in cui è stata dimostrata la presenza di virus influenzale tipo A, è stato possibile associare ai risultati ottenuti dalle diverse indagini di laboratorio, quelli dell'indagine istopatologica. In due casi (11%) il sottotipo isolato era H3N2, in 5 casi (28%) H1N2, in 6 casi H1N1 (33%). In 3 casi il virus influenzale isolato è risultato non tipizzabile (NT), mentre in due casi per il ceppo isolato non è stata possibile una completa sottotipizzazione, mancando in un caso la caratterizzazione dell'emoagglutinina (H*N2) e in un altro quella della neuraminidasi (H1N*). In 14 casi su 18 (77,8%) la diagnosi d'influenza suina è stata confermata dal quadro istopatologico, presentante aspetti di polmonite bronchiolo-interstiziale con necrosi dell'epitelio bronchiolare, che unitamente ai risultati delle altre indagini di laboratorio hanno permesso di confermare l'eziologia della forma respiratoria osservata. In 7 casi su 18 si osservava la co-infezione con il PCV2. In tutti questi casi l'indagine istopatologica, unitamente all'indagine immunoistochimica (IHC), ha evidenziato forme d'infezione sub-clinica da PCV2. In 4 casi su 18 si osservava la co-infezione con *M. hyopneumoniae*, mentre in 11 casi su 18 è stata dimostrata la presenza di PRRSv.
Campionamento attivo
La maggior parte delle aziende monitorate, che erano state scelte per una storica circolazione di virus influenzali, ha confermato la circolazione di IAV tra gli animali allevati e, nel 50% di queste, è stata dimostrata virologicamente la persistenza di un determinato sottotipo, in campionamenti eseguiti a distanza di >6 mesi. I risultati del campionamento attivo nelle aziende sono riassunti in Figura 1.

Figura 1. Positività in percentuale rilevata mediante PCR per la ricerca di PRRS e IAV nelle 32 aziende campionate attivamente nel corso del progetto da animali che non presentavano forme respiratorie significative.
Figure 1. Percentage of positive farms tested by PCR for PRRS and IAV, among the 32 farms where the pigs actively sampled did not show significant respiratory signs.



Anche in questi campioni l'agente virale maggiormente rilevato (69%) è stato PRRSv, ma anche la circolazione di influenza è stata evidenziata nel 46% dei casi. PRCV è stato rilevato solo nel 3% dei conferimenti.

Analisi sierologiche

In due aziende, campionate attivamente, è stato possibile esaminare il sangue di 30 animali dopo due settimane circa la dimostrazione della circolazione di virus influenzali. I sieri convalescenti, prelevati da un gruppo di 30 animali con dimostrata circolazione virale, sono stati esaminati con test ELISA anti nucleoproteina e con test HI utilizzando ceppi virali caratterizzati e utilizzati routinariamente nella prova di laboratorio e i ceppi stessi isolati dalle aziende. In una delle due aziende, dove sono stati rilevati due ceppi virali circolanti, nello specifico H1B1.2.2N2 e H1C.2.5N1, la sierologia in ELISA ha mostrato positività in tutto il gruppo di animali. Il test HI invece ha dato risultati differenti. Infatti utilizzando il ceppo di routine e il ceppo isolato, appartenenti entrambi al lineaggio H1B1.2.2N2, si è rilevato il 100% di animali sieropositivi. Invece, utilizzando il ceppo di routine o il ceppo circolante appartenenti allo stesso lineaggio H1C ma con sub-clade differenti (H1C2.1N1 e H1C.2.5N1), si è osservata positività solo verso il ceppo circolante in azienda.

Nella seconda azienda, dove era stata rilevata la circolazione di due ceppi identificati come H1C.2.1N1 e H1C.2.4N2, a fronte di una positività per ELISA NP nel 100% degli animali campionati, i risultati HI sono stati differenti. Il ceppo H1C.2.1N1 utilizzato nella routine diagnostica non ha rilevato alcuna positività in HI mentre l'utilizzo dei virus omologhi ha permesso di rilevare come il 100% degli animali fosse positivo per l'omologo H1C.2.1N1 e il 45% verso il virus H1C.2.4N2.

Caratterizzazione IAV rilevati

Sottotipi rilevati

È stato possibile tipizzare in modo completo, mediante RT-PCR multiplex, 121 campioni provenienti da 118 allevamenti positivi. Tra i campioni tipizzati, è stato evidenziato che il sottotipo H1CN1 è stato quello maggiormente rilevato, con una percentuale del 35%, seguito dal sottotipo H1CN2 (26%), da H1AN1 (17%) e da H3N2 (3,2%). In 3 aziende è stata

dimostrata la contemporanea circolazione di due sottotipi influenzali differenti, inoltre in 4 aziende sono stati rilevati più sottotipi influenzali diversi nel corso di focolai temporalmente distinti, mentre in 2 aziende è stata evidenziata la circolazione dello stesso sottotipo in episodi respiratori successivi.
Dei 15 conferimenti positivi per influenza, monitorati attivamente, è stato possibile tipizzare in PCR 12 di questi. La tipizzazione molecolare dei sottotipi circolanti nei conferimenti positivi ha mostrato una circolazione, nel 36% circa dei casi, del sottotipo H1CN2, seguito da H3N2 (23%) e da H1AN1, H1CN1 e H1BN2 (14% ciascuno). In due casi (16%) abbiamo rilevato la presenza di due sottotipi circolanti contemporaneamente nella stessa azienda.
Analisi genetica
Per aumentare l'informazione genetica, tutti i ceppi swIAV isolati dalle diverse attività descritte, sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma. È stato pertanto possibile effettuare il sequenziamento di 207 virus (195 da sorveglianza passiva e 12 da sorveglianza attiva) e conseguentemente avere una più dettagliata caratterizzazione genetica dei ceppi, caratterizzando in prima istanza il lineaggio delle emoagglutinine rilevate per ciascun sottotipo e successivamente le combinazioni di geni interni (Figura 2).
Essendo i dati da forme respiratorie più numerosi, è stato possibile evidenziare una elevata variabilità, maggiore di quella osservata con monitoraggio attivo, che ha visto la presenza, fra i virus H1N1, di 5 clade genetici diversi di HA H1, in combinazione con 2 clade per NA descritti come av-like e pdm09.
La combinazione dei segmenti genici di ciascun virus è stata classificata con identificazione alfanumerica progressiva ed è stata calcolata la percentuale di ciascun genotipo per ogni sottotipo. A questo si deve aggiungere che le diverse combinazioni di geni interni di origine av-like e pdm09 hanno dato origine ai 13 genotipi diversi riscontrati per H1N1. Per quanto riguarda il sottotipo H1N2 si sono osservati 7 lineaggi di geni per emoagglutinina, due per neuraminidasi e due per geni interni, con una combinazione finale di 15 genotipi diversi. È rilevante notare che in questi tre anni, la maggior parte di virus con emoagglutinina pandemica 1A.3.3.2 rilevati appartenevano ad un nuovo genotipo riassortante che abbiamo già descritto come emergente a partire dall'anno 2020 (Chiapponi, C. et al. 2021). Il sottotipo H3N2, che circola sempre a livelli inferiori rispetto agli altri sottotipi, si è mostrato il più stabile geneticamente, con la circolazione di 2 soli genotipi.
Analizzando la variabilità dei ceppi circolanti nei focolai di malattia respiratoria, l'analisi si è focalizzata sui geni codificanti per emoagglutinine (H1 e H3). Si è osservato che la maggior parte dei virus con emoagglutinina di origine aviare (H1C) si ritrovavano in numerosi *clades* genetici europei, con elevata variabilità, ed è noto che abbiamo reattività antigeniche differenti (Henritzi et al. 2020).
D'altra parte invece i virus con emoagglutinina *hu-like*, anche in questo recente periodo, hanno continuato ad appartenere per la stragrande maggioranza al gruppo 1B1.2.2, che è riportato circolare solo in territorio italiano.
I virus H1A dal 2021 raggruppavano quasi esclusivamente in un nuovo sub-*clade* identificato nel 2020 con ceppi adattati al suino (Chiapponi, C. et al. 2021). Non sono stati evidenziati eventi di trasmissione di virus di origine pdm-like da uomo a suino.
Per quanto riguarda i virus H3N2, la maggior parte di sequenze ottenute nel corso del progetto raggruppavano con recenti H3N2 suini isolati in Italia ma, tre sequenze (2021-2022-2023) invece, sono risultate essere frutto di un riassortimento fra virus umani e suini, con HA di origine recente stagionale umana (Other-human-2010) in associazione a geni suini. Le tre sequenze sono state ottenute da animali provenienti da allevamenti differenti.

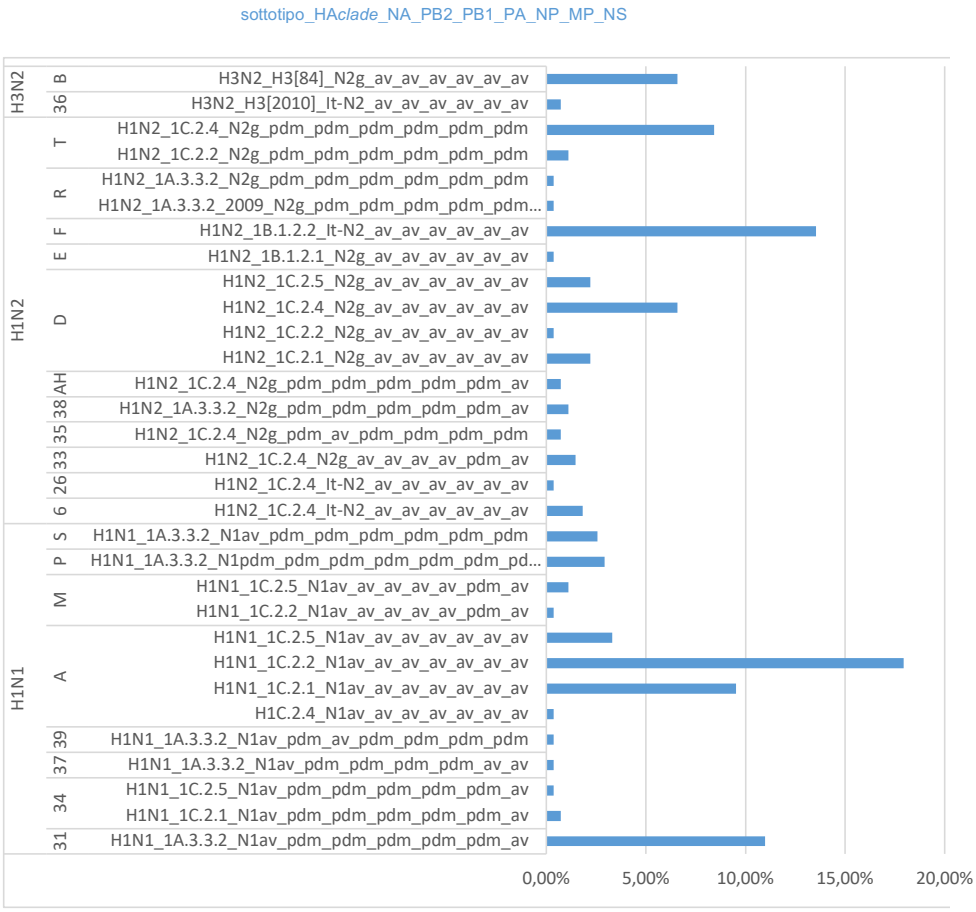


Figura 2. Combinazioni genetiche, espresse in percentuale, rilevate fra i virus sequenziati nel corso del progetto e provenienti da sorveglianza passiva sui casi di forma respiratoria. L'origine di ciascun segmento genetico è descritta precedentemente (Chiapponi, C. et al. 2021) e descritta come pdm (derivato da H1N1pdm09) o av (derivato da H1N1 av-like) per i geni codificanti proteine interne, distinto in vari *clade* per H1 (1A, 1B o 1C) e distinto in per NA: N1av, N2g o It-N2. All'interno di ciascun sottotipo, sono state calcolate le percentuali relative ai differenti genotipi rilevati e descritti dalla sequenza genetica sottotipo_HA*clade*_NA_PB2_PB1_PA_NP_MP_NS. H3[84] corrisponde al *clade* 1970.1 e H3[2010] corrisponde al *clade* Other_human_2010 secondo l'attuale nomenclatura (Anderson, Tavis K. et al. 2021).

Figure 2. Genetic combinations in percentage detected among the viruses coming from passive surveillance. The origin of each gene segment is described previously (Chiapponi, C. et al. 2021) and described as pdm (derived from H1N1pdm09) or av (derived from H1N1 av-like) for internal protein coding genes, distinguished in various *clade*s for H1 (1A, 1B or 1C) and distinguished into for NA: N1av, N2g or It-N2. Within each subtype, the percentages relating to the different genotypes detected and described by the genetic sequence subtype_HA*clade*_NA_PB2_PB1_PA_NP_MP_NS were calculated. H3[84] corresponds to the 1970.1 *clade* and H3[2010] corresponds to the Other_human_2010 *clade* according to the current nomenclature (Anderson, Tavis K. et al. 2021).

DISCUSSIONE

Dai risultati preliminari dei campioni della sorveglianza passiva è stato possibile confermare che, nonostante manifestino una elevata variabilità genetica, i virus influenzali suini sono maggiormente isolati a livello di alte vie respiratorie e in minore percentuale da campioni prelevati da animali deceduti, a differenza del virus PRRSv che è stato rilevato con maggiore frequenza da tessuto polmonare prelevato da suini deceduti. Anche *M. hyopneumoniae* e PCV2 sono stati rilevati con frequenza significativa nei campioni conferiti per diagnosi di PRDC. Il Coronavirus respiratorio del suino è stato dimostrato esclusivamente da tamponi nasali con forme respiratorie. Tra gli agenti batterici maggiormente rilevati vi è *P. multocida*. Dall'analisi delle co-infezioni con influenza si è confermata una importante casistica di positività per *P. multocida,* nonché di un circa 40%-50% di polmoni con positività anche per PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSv. L'impiego dell'istopatologia, attraverso la valutazione morfologica delle lesioni, è risultato avere un ottimo potere discriminante tra infezioni cliniche e sub-cliniche, permettendo di superare la semplice dimostrazione della presenza del virus influenzale, andando a verificare le lesioni tipiche che questo determina a livello polmonare. Questo appare molto importante, soprattutto nella diagnosi di PRDC. L'analisi dei campioni prelevati dalle aziende monitorate attivamente ha invece permesso di rilevare una bassissima circolazione di PRCV e una rilevante positività verso PRRS e swIAV. L'indagine conoscitiva sulla circolazione di SOV e REV fra i suini italiani ha dimostrato che anche sul nostro territorio questi virus circolano fra gli animali, seppur con una percentuale inferiore rispetto agli altri patogeni indagati e il loro ruolo nei casi di PRDC rimane tuttavia da approfondire.

La circolazione nei focolai di malattia respiratoria di swIAV ha visto il rafforzarsi dei sottotipi H1N1 e H1N2 con emoagglutinina H1C, mentre attivamente sono risultati circolare maggiormente, e quindi in maniera silente, H1CN2 ma anche H3N2. La circolazione di diversi lineaggi di emoagglutinine H1 rende complessa la catalogazione dei diversi sottotipi e mette in evidenza l'importanza di una corretta diagnostica mediante RT-PCR multiplex ma, ancora più risolutiva, mediante sequenziamento genomico. Gli stipiti appartenenti ai tre sottotipi circolanti in tre anni di studio, sono stati a loro volta ascritti a ben 21 genotipi diversi, in base all'attribuzione dei lineaggi per ciascun segmento genico considerato. Per quanto riguarda gli H1N1, si è osservata una consistente circolazione di stipiti di origine Nord Europea con un'aumentata introduzione di ceppi con emoagglutinina di tipo H1C e H1A che dimostrano di avere una migliore *fitness* nella specie suina rispetto a quelli precedentemente rilevati. Tutta la variabilità genetica ha conseguenze importanti dal punto di vista diagnostico per l'importanza che rivestono le metodiche di *screening* per influenza A (RT-PCR per gene M) e sierologia in ELISA anti-NP. Le metodiche caratterizzanti i sottotipi sono importanti come secondo livello di diagnosi ma le tecniche HI, utilizzate con sottotipi non corrispondenti ai ceppi circolanti a livello aziendale, in particolare per i ceppi con emoagglutinina H1C, possono fornire risultati falsi negativi in alta percentuale. Data quindi la documentata circolazione attiva dei virus influenzali tra la popolazione suina, e dato il fatto che nel nostro territorio persistono i ceppi endemici, l'introduzione continua di virus da regioni ad alta densità suinicola con altresì elevata circolazione e diversificazione virale, rende il nostro paese un sito da monitorare costantemente. Ulteriori indagini sono necessarie per attribuire correttamente il ruolo di SOV e REV nell'ambito della PRDC.

sottotipo: HA/dd_NA/dd_NP2_PB1/PA_NP_MP_NS

RINGRAZIAMENTI

Studio finanziato con Progetto Ricerca Corrente IZS LE 2020005 e dal progetto ICRAD PIGIE. Gli autori ringraziano tutti i veterinari di campo che hanno collaborato volontariamente all'indagine attiva nelle aziende.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, T.K., Macken, C.A., Lewis, N.S., Scheuermann, R.H., Van Reeth, K., Brown, I.H., Swenson, S.L., Simon, G., Saito, T., Berhane, Y., Ciacci-Zanella, J., Pereda, A., Davis, C.T., Donis, R.O., Webby, R.J., Vincent, A.L., (2016). A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses. mSphere 1: e00275-Dec.
2. Anderson, T.K., Chang, J., Arendsee, Z.W., Venkatesh, D., Souza, C.K., Kimble, J.B., Lewis, N.S., Davis, C.T., Vincent, A.L., (2021). Swine Influenza A Viruses and the Tangled Relationship with Humans. Cold Spring Harb Perspect. Med. 11: a038737. doi: 10.1101/cshperspect.a038737.
3. Burke, D.F., Smith, D.J., (2014). A recommended numbering scheme for influenza A HA subtypes. PLoS One 9: e112302.
4. Chiapponi, C., Prosperi, A., Moreno, A., Baioni, L., Faccini, S., Manfredi, R., Zanni, I., Gabbi, V., Calanchi, I., Fusaro, A., Beato, M.S., Cavicchio, L., Torreggiani, C., Alborali, G.L., Luppi, A., (2021). Genetic Variability among Swine Influenza Viruses in Italy: Data Analysis of the Period 2017-2020. Viruses 14: 10.3390/v14010047.
5. Chiapponi, C., Prosperi, A., Moreno, A., Baioni, L., Faccini, S., Manfredi, R., Zanni, I., Gabbi, V., Calanchi, I., Fusaro, A., Beato, M.S., Cavicchio, L., Torreggiani, C., Alborali, G.L., Luppi, A., (2021). Genetic Variability among Swine Influenza Viruses in Italy: Data Analysis of the Period 2017-2020. Viruses 14: 47. doi: 10.3390/v14010047.
6. Corzo, C.A., Morrison, R.B., Fitzpatrick, A.M., Risk factors for detecting influenza A virus in growing pigs.
7. Graaf-Rau, A., Hennig, C., Lillie-Jaschniski, K., Koechling, M., Stadler, J., Boehmer, J., Ripp, U., Pohlmann, A., Schwarz, B., Beer, M., Harder, T., (2023). Emergence of swine influenza A virus, porcine respirovirus 1 and swine orthopneumovirus in porcine respiratory disease in Germany. Emerg. Microbes Infect. 12: 2239938.
8. Henritzi, D., Petric, P.P., Lewis, N.S., Graaf, A., Pessia, A., Starick, E., Breithaupt, A., Strebelow, G., Luttermann, C., Parker, L.M.K., Schroder, C., Hammerschmidt, B., Herrler, G., Beilage, E.G., Stadlbauer, D., Simon, V., Krammer, F., Wacheck, S., Pesch, S., Schwemmle, M., Beer, M., Harder, T.C., (2020). Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses. Cell. Host Microbe .
9. Nelson, M.I., Stratton, J., Killian, M.L., Janas-Martindale, A., Vincent, A.L., (2015). Continual Reintroduction of Human Pandemic H1N1 Influenza A Viruses into Swine in the United States, 2009 to 2014. J. Virol. 89: 6218-6226.
10. Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Crehan, 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: 80-8.
11. Simon, G., Larsen, L.E., Durrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., Markowska-Daniel, I., Reid, S.M., Dan, A., Maldonado, J., Huovilainen, A., Billinis, C., Davidson, I., Aguero, M., Vila, T., Herve, S., Breum, S.O., Chiapponi, C., Urbaniak, K., Kyriakis, C.S., ESNIP3 consortium, Brown, I.H., Loeffen, W., (2014). European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. PLoS One 9: e115815.

12. Watson, S.J., Langat, P., Reid, S.M., Lam, T.T., Cotten, M., Kelly, M., Van Reeth, K., Qiu, Y., Simon, G., Bonin, E., Foni, E., Chiapponi, C., Larsen, L., Hjulsager, C., Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Durrwald, R., Schlegel, M., Huovilainen, A., Davidson, I., Dan, A., Loeffen, W., Edwards, S., Bublot, M., Vila, T., Maldonado, J., Valls, L., ESNIP3 Consortium, Brown, I.H., Pybus, O.G., Kellam, P., (2015). Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. J. Virol. 89: 9920-9931.
13. WOAH, 2023. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

IMPIEGO DI FITOPRODOTTI IN COMPARAZIONE A ZnO FARMACOLOGICO COME STRATEGIA PER SOSTENERE LA SALUTE INTESTINALE DEI SUINI IN SVEZZAMENTO

USE OF PHYTOPRODUCTS TO REPLACE PHARMACOLOGICAL DOSE OF ZnO AS A STRATEGY TO SUSTAIN THE INTESTINAL HEALTH OF WEANING PIGS

TREVISI P[1]., CORREA F[1]., NEGRINI C[1]., VIRDIS S[1]., DEL ZOZZO F[2]., MAZZONI M[3]., LUISE D[1].

[1]*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) - Università di Bologna*
[2]*Chemifarma Spa*
[3]*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMVET) - Università di Bologna*

Parole chiave*: Cinnamaldeide, E. coli, Ossido di zinco*
Keywords**:** *Cinnamaldehyde, E. coli, Zinc oxide*

Riassunto
Lo studio ha valutato l'effetto di due fitoprodotti sulla salute, accrescimento e salute intestinale di suinetti nel post-svezzamento. Questi prodotti sono noti per la loro attività antinfiammatoria e antiossidante e sono una possibile alternativa allo ZnO a dosi farmacologiche, recentemente vietato. Allo svezzamento (d0), 96 suinetti sono stati pesati e divisi in 4 gruppi: CO=gruppo di controllo (nessuna additivazione); ZnO=gruppo con 2500 ppm di ossido di Zn; Mix1=gruppo con 1500 mg/kg di mix (cinnamaldeide ed oli essenziali di ajowan e chiodi di garofano); Mix2= gruppo con 2000 mg/kg di mix (cinnamaldeide, eugenolo e acidi grassi a media e corta catena). I suini sono stati pesati settimanalmente fino al giorno 35 post-svezzamento; le feci sono state campionate ai giorni 13 e 35. Ai giorni 14 e 35, 8 suini/gruppo sono stati sacrificati per raccogliere il contenuto e la mucosa del digiuno distale al fine di analizzarne pH ed i parametri di morfologia intestinale. Il Mix1 ha mostrato gli stessi risultati del gruppo ZnO per quanto concerne le performance. Le performance del gruppo Mix2 sono state inferiori rispetto ai gruppi CO e ZnO ($P<0.05$). Il Mix 1 ha ridotto l'escrezione di *E. coli* emolitici rispetto al gruppo CO ($P=0.01$) e si è registrata una variazione di diversi generi microbici tra i gruppi. In conclusione, il Mix1 ha permesso di mantenere la salute intestinale dei suinetti in post-svezzamento attraverso la modulazione del microbiota intestinale, mentre il Mix2 non ha aiutato i suinetti.

Abstract
The aim of the present study was to evaluate the effect of two different phytoproducts on the health, growth and gut health of post-weaning piglets. These additives are known for their antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities and could serve as an alternative to the recently banned use of ZnO in pharmacological doses. At weaning (d0), 96 piglets were weighed and divided into four groups: CO = control group (no additives); ZnO = group with 2500 ppm Zn oxide; Mix1 = group with 1500 mg/kg mixture (cinnamaldehyde and essential oils of ajowan and cloves); Mix2 = group with 2000 mg/kg mixture (cinnamaldehyde, eugenol and short-medium chain fatty acids). Pigs were weighed weekly until day 35; faeces were collected on days 13 and 35 for microbiota analysis. On days 14 and 35, 8 pigs/group were sacrificed to collect gut contents and

mucosa samples for pH and gut morphology analysis. Mix1 showed the same results as the ZnO group in terms of growth performance. The growth performance of the Mix2 group was lower than that of the CO and ZnO groups ($P<0.05$). Mix1 reduced the abundance of haemolytic *E. coli* compared to the CO group ($P=0.01$) and there was a variation of different microbial genera between the groups. In conclusion, Mix1 allowed to maintain the gut health of postweaning piglets by modulating the gut microbiome and reducing haemolytic *E. coli*, while Mix2 did not help the piglets.

INTRODUZIONE

La fase post-svezzamento è riconosciuta come una delle fasi produttive più critiche per la salute e la crescita dei suinetti. La recente attenzione per la diffusione del fenomeno di antibiotico resistenza ha limitato fortemente le modalità e l'impego di taluni antibiotici e dell'ossido di zinco (ZnO) a dosi farmacologiche che venivano ampiamente utilizzati per mantenere salute intestinale e accrescimento dei suinetti in questa fase. Pertanto, nuove strategie volte ad affrontare e limitare le problematiche legate allo svezzamento sono necessarie. Tra queste, le strategie alimentari basate sull'impego di specifici additivi quali fitoprodotti hanno mostrato risultati promettenti. Tra le sostanze bioattive più studiate tra i fitoprodotti vi sono carvacrolo, eugenolo, cinnamaldeide, timolo e capsaicina (Huang e Lee, 2018). Queste sostanze hanno mostrato degli effetti positivi sui suinetti in termini di riduzione dei processi infiammatori, miglioramento dell'integrità e assorbimento della mucosa intestinale, della digeribilità della dieta e delle performance di crescita. Tuttavia, i risultati osservati in letteratura mostrano una certa variabilità tra i fitoprodotti dovuta a dosi e combinazione delle sostanze incluse nel prodotto (Huang e Lee, 2018).

La continua ricerca volta a testate ed evidenziare l'efficacia o meno di fitoprodotti è pertanto utile al fine di identificare valide soluzioni alternative all'impego di ZnO a dosi farmacologiche per mantenere la salute intestinale e l'efficienza dei suinetti nel periodo post-svezzamento.

Un'ulteriore promettente strategia alimentare evidenziata come alternativa allo ZnO è l'impego di acidi organici a media e corta catena; infatti il loro impego nella dieta dei suinetti può controllare la diffusione di fenomeni di diarrea post svezzamento, riducendo la proliferazione degli agenti patogeni nell'intestino e quindi migliorando le performance (Correa et al., 2021).

Poiché acidi e fitoprodotti hanno modalità d'azione diverse, è possibile che la loro combinazione possa essere sinergica (Langhout, 2020).

Considerato quanto riportato, è stato ipotizzato che l'impego di diversi fitoprodotti miscelati o meno con acidi organici potrebbe essere buona strategia per sostituire lo ZnO a dosi farmacologiche per migliorare la salute dei suinetti nella fase post svezzamento. L'obbiettivo del presente studio è pertanto di valutare l'effetto della somministrazione e le modalità d'azione di due diversi fitoprodotti a base di cinnamaldeide, timolo, carvacrolo ed eugenolo da solo o in combinazione con una miscela di acidi organici rispetto alla dose farmacologica di ZnO sulla la salute, salute intestinale e performance di suini svezzati.

MATERIALI E METODI

Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico per la sperimentazione animale dell'Università di Bologna e dal Ministero della Salute (ID:1280, CODICE: 2216A.N.NFJ)

La prova ha coinvolto un totale di 96 suinetti che al giorno dello svezzamento (26 ±2 giorni di età - d0) sono stati divisi in 4 gruppi, bilanciati per peso e nidiata di appartenenza:

1) **CO**: gruppo controllo con nessun additivo aggiunto;
2) **Zn**: 2500 ppm per i primi 14 giorni post-svezzamento;
3) **Mix1**: 1500 mg/kg di un mix costituito da cinnamaldeide (naturalmente identica), olio di cassia (titolato in cinnamaldeide), olio essenziale di ajowan (titolato in timolo), olio essenziale di chiodi di garofano (titolato in eugenolo) dal d0 al d35.
4) **Mix2**: 200 mg/kg di un mix costituito da acidi grassi in forma estere, eugenolo (naturale sintetico identico), cinnamaldeide (sintetico identico naturale) e salicilato di metile (sintetico).

Il Mix1 e Mix2 erano prodotti forniti da Chemirfarma Spa (Forlì, Italia) ed erano entrambi microincapsulati.
I suinetti sono stati pesati individualmente all'arrivo e settimanalmente fino al d35 post svezzamento. Il consumo di alimento è stato misurato giornalmente al fine di calcolare l'indice di conversione alimentare (ICA). Al d13 e d35, da 16 suinetti per gruppo è stato prelevato un tampone rettale per analisi del profilo microbico e per la conta su piastra di *E. coli* totali e *E. coli* emolitici (solo d13). Il DNA batterico è estato estratto utilizzando il kit di estrazione (FastDNATMSpin Kit for Soil, MP Biomedicals Europe, LLC) ed il profilo microbico è stato caratterizzato sequenziando le regioni V3-V4 del gene 16S rRNA. Per l'analisi bioinformatica, è stata utilizzata la pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016) la tassonomia è stata assegnata usando come riferimento il Silva Database (release 138.1). Per le conte microbiche, i campioni sono stati diluiti 1:10 e seminati in piastre con terreno Triptone-bileglucuronide. Le piastre sono state incubate in aerobiosi per 24 ore a 44 C. I batteri emolitici sono stati contati in piastre agar sangue (Oxoid Pb5039A) dopo incubazione aerobica per 1 giorno mediante conferma utilizzando Tryptone Bile X glucoronide Agar (Oxoid). Ai d14 e d35, 8 suinetti per gruppo sono stati sacrificati ed un campione di mucosa di digiuno è stato fissato in paraffina per le analisi istologiche seguendo la procedura descritta da Trevisi et al., (2009). Inoltre il contenuto intestinale di digiuno distale, colon e cieco è stato campionato per determinare il pH.
Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R versione 4.1.1. I dati sono stati analizzati utilizzando un modello lineare misto e un test ANOVA che includeva come fattore fisso la dieta e come fattori random la nidiata ed il box di appartenenza. Per le analisi di l'alfa diversità microbica è stato utilizzato un modello ANOVA considerando come fattori la dieta e la nidiata. Per la beta diversità è stato utilizzato un modello PERMANOVA (procedura "adonis"), considerando come fattori dieta e nidiata utilizzando come matrice di distanza Bray-Curtis.

RISULTATI

In **Tabella 1** sono riportati i risultati relativi all'effetto della dieta sui parametri di accrescimenti dei suini durante la prova. La dieta non ha influenzato il peso degli animali. L'IPG non è stato differente tra le diete nella prima settimana post-svezzamento e nei periodi d14-d28, d28-d35, d14-d35, d0-d35 mentre nei periodi d7-d14 e d0-d14 il Mix2 ha avuto un IPG inferiore rispetto ai gruppi CO e ZnO ($P<0.05$). L'ingestione alimentare non è stata differente tra le diete nella prima settimana e nei periodi d14-d28, d28-d35, d14-d35 mentre nel periodo d7-d14 il Mix2 ha avuto un'ingestione inferiore rispetto al gruppo CO ($P<0.05$) e nel periodo d0-d14 tendenzialmente inferiore rispetto ai gruppi CO e ZnO ($P<0.10$). Nel periodo d0-d35 il gruppo Mix2 ha avuto un'ingestione tendenzialmente inferiore rispetto al gruppo Mix 1 ($P<0.01$). L'ICA non è stata differente tra diete nella prima settimana e nei periodi d14-d28, d28-d35, d14-d35, d0-d35 mentre nei periodi d7-d14 e d0-d14, il Mix2 ha avuto un ICA superiore rispetto ai gruppi CO e ZnO ($P<0.05$); il gruppo Mix1 ha avuto un ICA superiore rispetto al gruppo CO ($P<0.05$) ma non differente rispetto al gruppo ZnO nel periodo d0-d14.

Tabella 1 - Effetto dell'integrazione della dieta dei Mix1 e Mix2 sulle performance di crescita di suini post svezzamento.
Table 1 - Effect of supplementation with Mix1 and Mix2 on live weight, daily weight gain, feed intake and feed-to-gain ratio of postweaning piglets.

Parametro	Dieta				SEM	p-Value
	CO	ZnO	Mix1	Mix2		
Peso vivo, g						
d0	7077	7066	7077	7041	325	1.00
d7	7811	7762	7970	7660	341	0.93
d14	10336	10124	10003	9346	403	0.31
d28	17720	17433	17243	16144	587	0.13
d35	22495	22235	22235	20541	722	0.12
Incremento ponderale giornaliero, g/giorno						
d0-d7	104.2	99	125.4	91.4	17.7	0.45
d7-d14	361 ^{A}	337 ^{A}	290 ^{AB}	240 ^{B}	26.7	<0.0001
d0-d14	233 ^{A}	218 ^{A}	208 ^{AB}	165 ^{B}	14.1	0.002
d14-d28	520	517	531	484	22.8	0.38
d28-d35	682	682	716	630	32.5	0.31
d14-d35	574	574	592	532	22.7	0.2
d0-d35	438	432	431	387	17.7	0.1
Ingestine giornaliera, g/giorno						
d0-d7	137	142	166	128	14.5	0.32
d7-d14	467 ^{A}	436 ^{AB}	448 ^{AB}	364 ^{B}	25.8	0.05
d0-d14	302 ^{a}	289 ^{ab}	307 ^{a}	246 ^{b}	16.5	0.05
d14-d28	813	787	811	714	34.2	0.17
d28-d35	1135	1172	1184	1065	50	0.35
d14-d35	921	915	935	831	35.7	0.18
d0-d35	673 ^{ab}	665 ^{ab}	684 ^{a}	597 ^{b}	25.5	0.09
Indice conversione alimentare						
d0-d7	1.37	1.59	1.33	1.47	0.1	0.27
d7-d14	1.3 ^{A}	1.29 ^{A}	1.56 ^{AB}	1.66 ^{B}	0.08	0.01
d0-d14	1.3 ^{A}	1.32 ^{A,b}	1.47 ^{b,C}	1.53 ^{C}	0.05	0.01
d14-d28	1.57	1.53	1.52	1.49	0.04	0.43
d28-d35	1.67	1.72	1.64	1.7	0.03	0.38
d14-d35	1.61	1.6	1.57	1.57	0.03	0.55
d0-d35	1.54	1.54	1.57	1.55	0.02	0.82

In **Tabella 2** sono riportati i risultati relativi all'effetto della dieta pH intestinale e conte microbiche fecali. Al d14, il gruppo ZnO ha avuto un pH cecale superiore rispetto agli altri gruppi (P<0.05) ed un pH del colon tendenzialmente superiore rispetto al gruppo Mix2 (P<0.1). Al giorno 35 non sono state osservate differenze nei valori di pH tra i gruppi. Al d13, il gruppo Mix1 ha avuto una minor abbondanza di *E. coli* emolitici rispetto al gruppo CO (P<0.05) mentre non sono state osservate differenze per la conta di *E. coli* totali.

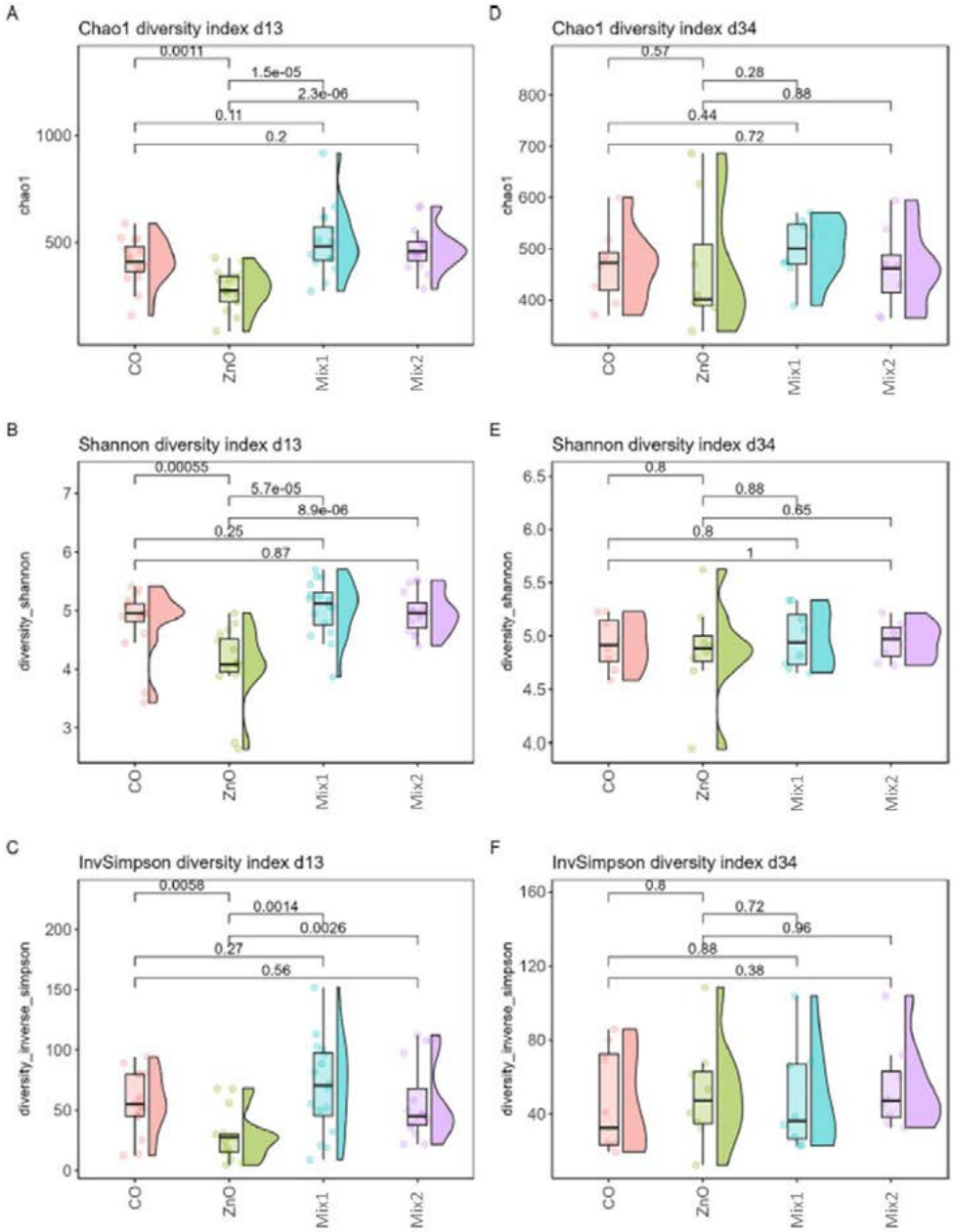
Tabella 2 – Effetto dell'integrazione della dieta dei Mix1 e Mix2 su pH intestinale e conte microbiche fecali di suini post svezzamento.
Table 2 - Effect of supplementation with Mix1 and Mix2 on gut pH and faecal bacterial count of postweaning piglets

Parametro	Dieta				SEM	p-Value
	CO	ZnO	Mix1	Mix2		
pH d14						
digiuno	7.06	7.31	6.99	7.22	0.13	0.33
cieco	6.13 ^{A}	6.65 ^{B}	5.82 ^{A}	5.84 ^{A}	0.1	<0.0001
colon	6.43 ^{ab}	6.79 ^{b}	6.46 ^{ab}	6.35 ^{a}	0.12	0.06
pH d35						
digiuno	7.49	7.6	7.6	7.4	0.11	0.53
cieco	6.04	6.27	6.01	5.99	0.11	0.24
colon	6.51	6.33	6.44	6.42	0.13	0.79
Conte microbiche d13, Log						
E. coli	5.27	4.97	4.56	5.4	0.4	0.47
haemolytic *E. coli*	2.64 ^{A}	2.25 ^{AB}	2.02 ^{B}	2.46 ^{AB}	0.16	0.05

I risulti in merito agli indici di alpha diversità del profilo microbico ai giorni d13 e d34 sono riportati in **Figura 1**. Al d13, il gruppo ZnO ha mostrato una riduzione di diversità rispetto ai gruppi CO (Chao1, P = 0,001; Shannon, P = 0,0006; InvSimpson, P = 0,0058), Mix1 (Chao1, P < 0,0001; Shannon, P = 0,0001; InvSimpson, P = 0,0014) e Mix2 (Chao1, P < 0,0001; Shannon, P = 0,0001; InvSimpson, P = 0,0026). Al d34, non sono state osservate delle differenze tra gruppi.

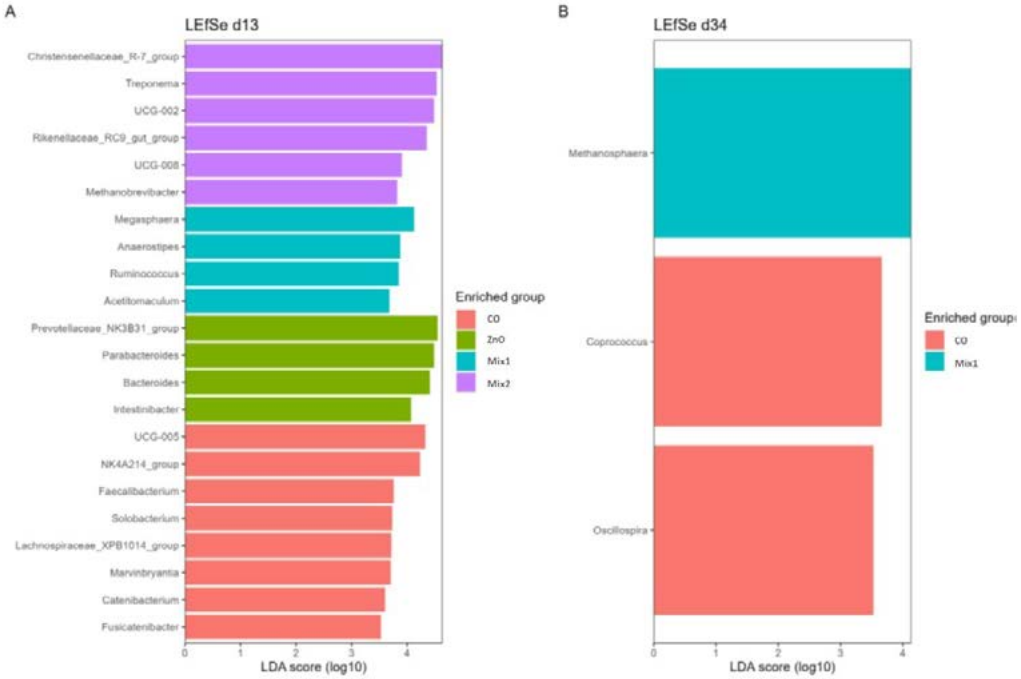
Figura 1. Effetto dell'integrazione con Mix1 e Mix2 sugli indici di diversità alfa dei campioni fecali dei suinetti post-svezzamento raccolti ai giorni 13 e 34. Indice Chao1 (A;D), indice di Shannon (B;E) e indice Inverse Simpson (InvSimpson) (C;F).

Figure 1. Effect of supplementation with Mix1 and Mix2 on alpha diversity indices of postweaning piglets faecal samples collected at days 13 and 34. Chao1 index (A;D), Shannon index (B;E) and Inverse Simpson (InvSimpson) index (C;F).



Per la Beta diversità, il test Adonis ha mostrato differenze significative per la dieta sia al d13 che al d35; in particolare, il gruppo ZnO aveva una composizione batterica significativamente diversa rispetto ai gruppi CO (R2 = 0,09, P < 0,001), Mix1 (R2 = 0,11, P < 0,001) e Mix2 (R2 = 0,11, P < 0,001). Al d34, la struttura batterica ha continuato a essere influenzata dalla dieta (R2 = 0,18, P = 0,046) ed è stata osservata una differenza tra ZnO e Mix1 (R2 = 0,1, P = 0,01). Per identificare marcatori batterici specifici dei diversi gruppi è stata condotta l'analisi della dimensione dell'effetto LDA ed i risultati sono riportati in **Figura 2.**

Figura 2. Effetto dell'integrazione con Mix1 e Mix2 sui biomarcatori microbici a livello di genere nei campioni fecali dei suinetti post-svezzamento raccolti ai giorni 13 (A) d34 (B).
Figure 2. Effect of supplementation with Blend1 and Blend2 on microbial biomarkers at genus level in postweaning piglets' faecal samples collected at days 13 (A) d34 (B).



In **Tabella 3** sono riportati i risultati relativi all'effetto della dieta su parametri morfologici del digiuno dei suini durante la prova. La dieta non ha influenzato alcun parametro al d14 mentre al d35 il gruppo Mix2 ha avuto un minor altezza dei villi intestinali rispetto al gruppo CO (P<0.05) e tendenzialmente un minor rapporto altezza villi/profondità cripte rispetto al gruppo CO (P<0.10).

Tabella 3 - Effetto dell'integrazione della dieta dei Mix1 e Mix2 su parametri morfologici del digiuno di suini post svezzamento.

Table 3 - Effect of supplementation with Mix1 and Mix2 on morphometric parameter in the jejunum of postweaning piglets.

Parametro	Dieta				SEM	p-Value
	CO	ZnO	Mix1	Mix2		
d14, µm						
altezza villi	289	292	273	247	25.3	0.59
larghezza villi	105	116	107	104	5.1	0.32
profondità cripte	226	239	210	236	22.9	0.8
larghezza cripte	50.1	53.1	63.9	48.1	8	0.52
altezza villi / profondità cripte	1.3	1.28	1.71	1.12	0.3	0.52
superficie assorbente	5.5	5.26	5.38	5.00	1.2	0.83
d35, µm						
altezza villi	279 ^{A}	267 ^{AB}	256 ^{AB}	234 ^{B}	11	0.05
larghezza villi	91.1	93.1	95.4	91.8	5.8	0.96
profondità cripte	164	164	171	169	6.6	0.85
larghezza cripte	30.6	28.7	31.6	30.7	1	0.25
altezza villi / profondità cripte	1.74 ^{a}	1.64 ^{ab}	1.5 ^{ab}	1.39 ^{b}	0.1	0.08
superficie assorbente	7.42	7.24	6.62	6.25	0.4	0.18

DISCUSSIONE

In base alla loro origine, i fitoprodotti possono esprimere attività antinfiammatoria, antiossidante e/o modulatrice del microbiota accreditandosi tra le strategie alternative all'uso della dose farmacologica di ZnO, recentemente vietato, per favorire la salute intestinale e l'accrescimento dei suinetti nella fase immediatamente successiva allo svezzamento.
Come atteso, la somministrazione di una dieta con dosi farmacologiche di Zn ha significativamente modulato l'ecologia microbica intestinale dei suinetti, desumibile dall'aumento del pH nell'intestino crasso e dalla riduzione della diversità microbica intestinale. Tali risultati sono da ascriversi alla conclamata attività dello ZnO nel modulare alcuni generi microbici, meccanismo d'azione che comporta la selezione di specifici microrganismi e una potenziale riduzione nella produzione di acidi grassi volatili che potrebbero aver contribuito ad un aumento del pH intestinale (Ortiz Sanjuán 2022; Heo et al., 2013).

L'impego del Mix1 che è costituito da un molecole microincapsulate di cinnamaldeide, olio di cassia, olio essenziale di ajowan e di chiodi di garofano non **è stato in grado di migliorare o influenzare l'IPG e l'ingestione dei suini, ha invece** tendenzialmente aumentato l'ICA degli animali nel periodo d0-d14 rispetto al gruppo CO ma non rispetto al gruppo ZnO. Sebbene gli effetti sulle performance siano stati trascurabili, l'impego del Mix1 ha influenzato l'ecosistema e la salute intestinale dei suinetti in modo differente rispetto all'impego di ZnO. Infatti, il MIx1 ha portato ad una riduzione nella conta di *E. coli* emolitici, patogeni responsabili della diarrea post-svezzamento, rispetto al gruppo CO, mentre lo stesso effetto non è stato osservato in seguito all'impego di ZnO. Tale effetto del Mix1 è ascrivibile all'attività antimicrobica dei suoi composti su tali batteri, come precedentemente riportato da studi *in vitro* (Chaieb et al., 2007; Goudarzi et al., 2011). Il Mix1, oltre a ridurre

E. coli emolitici ha modificato l'abbondanza di alcuni batteri commensali, che, a sua volta, potrebbero aver contribuito alla riduzione del patogeno. Infatti, il Mix1 ha favorito lo sviluppo di alcuni generi microbici associati alla produzione di acidi grassi volativi quali il genere *Acetitomaculum*, produttore di acetato (Greening e Leedle, 1989) e *Ruminococcus* e *Megasphaera*, entrambi noti per la produzione di butirrato (Claesson et al., 2012; Counotte et al., 1981). In accordo con il presente studio, i risultati ottenuti da Da Silva et al. (2022) e Li et al. (2018) confermano che fitoprodotti a base di aldeide cinnamica, timolo, carvacrolo ed eugenolo sono in grado di favori la colonizzazione intestinale da parte di *Ruminococcus* e *Megasphaera.*

L'integrazione nella dieta del Mix2, composto da cinnamaldeide, eugenolo, metil salicilato e mono e digliceridi degli acidi propionico, butirrico, caprilico, caprico, ha contributo a modificare il microbiota intestinale rispetto al gruppo ZnO (maggiore diversità microbica e promozione di alcuni generi) e ad abbassare il pH intestinale tuttavia tali cambiamenti non hanno avuto alcun riverbero positivo sulle performance di crescita. Il Mix2 ha infatti ridotto le prestazioni di crescita dei suinetti allo svezzamento rispetto sia al gruppo CO che al gruppo ZnO, soprattutto durante i primi quattordici giorni post-svezzamento. Diversi studi hanno suggerito che mix di oli essenziali sintetici e acidi organici possono avere effetti positivi sulla modulazione dei patogeni intestinali (Hulánková e Bořilová, 2011) e promuovere la crescita e salute dei suinetti (Caprarulo et al., 2022). Tuttavia, altri studi hanno suggerito che i risultati positivi possono dipendere dalla dose di integrazione; infatti dosi troppo elevate possono compromettere le performance soprattutto in seguito all'odore pungente ed indesiderato degli additivi che può portare a una riduzione volontaria dell'ingestione da parte dei suini (Zentek et al., 2011), come osservato in questo studio. Inoltre, la riduzione dell'ingestione alimentare potrebbe aver contributo al peggioramento delle condizioni della mucosa intestinale osservate in questo studio (riduzione dell'altezza dei villi intestinali e della capacità assorbente) come suggerito da Dong e Pluske, 2007. Questi effetti negativi del Mix2 potrebbero essere dovuti ad una dose troppo elevata dei principi attivi del mix o ad una non ottimale incapsulamento del prodotto stesso.

CONCLUSIONI

In conclusione, l'impego di fitoprodotti nelle diete post-svezzamento potrebbe rappresentare una potenziale strategia per mantenere la salute intestinale dei suinetti. Tuttavia, l'efficacia di queste miscele varia a seconda della loro composizione e della dose di inclusione nella dieta. L'inclusione del Mix1 alla dose di 150 g su 100 kg di mangime ha permesso di modulare il microbioma intestinale promuovendo l'abbondanza di microrganismi in grado di produrre acidi grassi a catena corta e riducendo invece l'abbondanza di potenziali batteri patogeni come l' *E. coli* emolitico; pertanto tale inclusione potrebbe essere valutata come una potenziale strategia per mantenere la salute intestinale dei suinetti post-svezzamento.

RINGRAZIAMENTI

I dati presentati sono stati raccolti nell'ambito del Progetto Agritech finazitao dall'unione europea Next-GenerationEU (PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA (PNRR) – MISSIONE 4 COMPONENTE 2, INVESTIMENTO 1.4 – D.D. 1032 del 17/06/2022, CN00000022). Si ringraziano per la collaborazione la società Chemifarma ed in particolare il Dott. Olia e la Dott.ssa Dal Zozzo per il loro contributo nella sperimentazione e fornitura dei prodotti testati. Si ringraziano inoltre l'l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, ed in particolare la Dott.ssa Bardasi per le analisi delle conte microbiologiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Callahan B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., (2016). "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data". Nature Met. 13:581–583.
2. Caprarulo, V., Turin, L., Hejna, M., Reggi, S., Dell'Anno, M., Riccaboni, P., Trevisi, P., Luise, D., Baldi, A., Rossi, L., (2022) "Protective effect of phytogenic plus short and medium-chain fatty acids-based additives in enterotoxigenic Escherichia coli challenged piglets". Vet Res. Comm. 47:217-231.
3. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., (2007) "The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): a short review". Phytotherapy Res. 21:501-506.
4. Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'connor, E. M., Cusack, S., ... & O'toole, PW. (2012) "Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly". Nature 488:178-184.
5. Correa, F., Luise, D., Castillo, M., Peris, S., Palomo-Yague, A., Bosi, P., Trevisi, P., (2021) "Effect of dietary supplementation with a blend of protected aromatic compounds, including benzoic acid, on growth performance and faecal microbial profile of weaned piglets as an alternative to Zinc Oxide". Livestock Sci. 246:104455.
6. Counotte, G.H.M., Prins, R.A., Janssen, R.H.A.M., Debie, M.J.A. (1981) "Role of Megasphaera elsdenii in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle". ApPEnv. Micro. 42:649-655.
7. da Silva, C. A., Dias, C. P., Callegari, M. A., Romano, G. D. S., Lais de Souza, K., Jacob, D. V., Goossens, T., (2022) "Phytogenics and encapsulated sodium butyrate can replace antibiotics as growth promoters for lightly weaned piglets". Plos one 17: e0279197.
8. Dong, G.Z, Pluske, J.R. (2007) "The low feed intake in newly-weaned pigs: problems and possible solutions". Asian-Australasian J Anim. Scie. 20: 440-452.
9. Goudarzi, G.R., Saharkhiz, M.J., Sattari, M., Zomorodian, K. (2011) "Antibacterial activity and chemical composition of Ajowan (Carum copticum Benth. & Hook) essential oil". J. Agri. Scie. Tech. 13: 203-208.
10. Greening, R.C., Leedle, J,A. (1989) "Enrichment and isolation of Acetitomaculum ruminis, gen. nov., sPnov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen". Arch. Micro. 151:399–406.
11. Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J., Nyachoti, C.M. (2013) "Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds". J. Ani Phys. Nutri. 97: 207-237.
12. Huang, C.M., Lee, T.T., (2018) "Immunomodulatory effects of phytogenics in chickens and pigs—A review". Asian-Australasian J. Ani. Sci 31: 617.
13. Hulánková, R., Bořilová, G., (2011) "In vitro combined effect of oregano essential oil and caprylic acid against Salmonella serovars, Escherichia coli O157: H7, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes". Acta Vet. Brno 80: 343-348.
14. Langhout, P(2020) "New additives for broiler chickens". World Poultry 16:22–27.
15. Li, Y., Fu, X., Ma, X., Geng, S., Jiang, X., Huang, Q., Han, X (2018) "Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets" Fron. Micro. 9:1988.
16. Ortiz Sanjuán, J. M., Manzanilla, E. G., Cabrera-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P. D., Garrido, J. J., & Argüello, H. (2022) "Using shotgun sequencing to describe the changes induced by in-feed zinc oxide and apramycin in the microbiomes of pigs one week postweaning". Micr Spectrum 10(4), e01597-22.

17. Trevisi, P., Melchior, D., Mazzoni, M., Casini, L., De Filippi, S., Minieri, L., Lalatta-Costerbosa, G. and Bosi, P., (2009) “A tryptophan-enriched diet improves feed intake and growth performance of susceptible weanling pigs orally challenged with Escherichia coli K881” J. Ani. Sci. 87:148–56.
18. Zentek, J., Buchheit-Renko, S., Ferrara, F., Vahjen, W., Van Kessel, A. G., Pieper, R. (2011) “Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets”. Ani. Health Res. Rev.12: 83-93.

UTILIZZO DELLA FARINA DI INSETTI NELL'ALIMENTAZIONE DEI SUINETTI IN POST-SVEZZAMENTO: VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE E DELLA DIGERIBILITÀ DEI NUTRIENTI

GROWTH PERFORMANCE AND NUTRIENT DIGESTIBILITY IN WEANED PIGLETS FED INSECT MEAL

FACCENDA M.[3], BIASATO I.[1], CORNALE P.[1], BADINO P.[2], ODORE R.[2], GERBINO E.[1], CONTE V.[1], BELLEZZA ODDON S.[1], RESCONI A.[1], GASCO L.[1]

[1]Department of Agricultural, Forest and Food Sciences, University of Torino; [2]Department of Veterinary Sciences, University of Torino; [3]Gruppo Ciemme

Parole chiave: Farina di insetti; Hermetia illucens; suini post-svezzamento
***Keywords*:** Insect meal; Hermetia illucens; weaned pigglets

Riassunto
La farina di Hermetia illucens (HI) è già stata testata sui suini, ma attualmente non sono disponibili dati in condizioni commerciali. Questo studio ha valutato gli effetti di diete contenenti farine di HI sulle prestazioni di crescita e sulla digeribilità dei nutrienti di suinetti svezzati allevati commercialmente. 336 suinetti svezzati a 28 giorni sono distribuiti in 4 diete di cui 3 con percentuali di inclusione diverse e una di controllo (4 box/dieta, 21 suinetti/box, 3 fasi di alimentazione [I, II e III]): C (controllo), HI3 (farina HI 3%), HI6 (farina HI 6%) e HI9 (farina HI 9%). Le prestazioni di crescita e i coefficienti di Digeribilità Apparente dei nutrienti fecali (ADCs) sono stati calcolati alla fine di ciascuna fase di alimentazione (giorni 13, 29 e 63). Al termine della prova, le performance complessive di crescita non sono state significativamente influenzate dall'inclusione della farina HI nella dieta (P<0,05). Al contrario sia le performance zootecniche che la digeribilità dei nutrienti hanno evidenziato differenze significative a seconda della fase di alimentazione.

Abstract
Hermetia illucens (HI) meal has already been tested on pigs, but no data is currently available under commercial conditions. This study evaluated the effects of HI diet on growth performance and nutrient digestibility of commercially weaned piglets. 336 piglets weaned at 28 days were assigned to 4 diets, 3 of which with different inclusion percentages and one control diet (4 pens/diet, 21 piglets/pen, 3 feeding phases [I, II and III]) : C (control), HI3 (HI meal 3%), HI6 (HI meal 6%) and HI9 (HI meal 9%). Growth performance and fecal nutrient apparent digestibility coefficients (ADCs) were calculated at the end of each feeding phase (days 13, 29, and 63). At the end of the test, the overall growth performance was not significantly influenced by the inclusion of HI meal in the diet (P<0.05). Differently both growth performance and digestibility highlighted significant differences depending on the feeding phase.

INTRODUZIONE

Negli allevamenti intensivi i fabbisogni proteici nelle razioni alimentari dei suini sono coperti principalmente dalla soia e dalla farina di pesce. Ad un aumento della domanda di queste due fonti proteiche si contrappone una diminuzione dell'offerta (FAO 2022); nel caso della soia si assiste a minori produzioni a livello mondiale e per quanto riguarda la farina di pesce l'intensificarsi delle attività di pesca ha ridotto la popolazione di pesci pelagici utili a questo scopo.

Una delle principali fonti di carne per l'uomo è rappresentata dall'industria suina (FAO, 2022). Negli ultimi 50 anni, la produzione globale di suini è quadruplicata e si prevede che continuerà a crescere nei prossimi tre decenni: ciò può avere un impatto significativo sull'uso dei mangimi e sulla domanda di terreni (Lassaletta et al., 2019).
Quale fonte proteica alternativa in campo zootecnico, ma non solo, stanno destando sempre maggiore interesse le farine di insetti. Con oltre 1900 specie, gli insetti commestibili rappresentano un'interessante alternativa nutrizionale (Van Huis, et al., 2013), infatti hanno un elevato contenuto di proteine e lipidi e possono essere allevati su substrati di rifiuti organici con un'elevata efficienza di conversione dei mangimi (Van Huis, 2013), consentendo così una "bioeconomia circolare".
In ambito zootecnico sono principalmente tre le specie allevate per la produzione di mangimi: Hermetia illucens, Tenebrio molitor e Musca domestica. Per il settore suinicolo non sono molti gli studi a disposizione anche a causa della quantità limitata di prodotti a base di insetti disponibili sul mercato, infatti le aziende produttrici di insetti hanno al momento dimensioni e capacità produttive contenute.
Inoltre, il prezzo dei prodotti a base di insetti risulta attualmente più elevato rispetto a quello degli ingredienti proteici utilizzati tradizionalmente limitandone di fatto un maggiore utilizzo. Di particolare interesse risulta Hermetia illucens non solo per le sue caratteristiche nutrizionali ma anche per il contenuto di particolari sostanze quali chitina, peptidi antimicrobici e acido laurico.
Alla base di questo studio sperimentale vi è l'analisi delle performance di crescita dei suinetti nella fase post-svezzamento alimentati con mangimi contenenti farina di Hermetia illucens (HI).

MATERIALI E METODI

Animali, dieta e campionamenti

La prova sperimentale è stata svolta in un sito 2 commerciale su 336 suinetti ibridi dal peso di ±6,170 kg allo svezzamento. All'accasamento i suinetti sono stati pesati individualmente e suddivisi nei box rispettando il criterio di omogeneità di peso. La prova ha previsto 16 box da 21 suinetti ciascuno, maschi e femmine. Inoltre, 8 suinetti per box (4 femmine e 4 maschi) sono stati identificati individualmente con una marca auricolare. Per rispettare un criterio di omogeneità durante tutta la durata della prova i suinetti sono stati accasati all'interno di una sola sala sottostando alle stesse condizioni microclimatiche di temperatura e umidità. Ciascun box presentava una mangiatoia a parete e due abbeveratoi a tazza antispreco. Il pavimento era fessurato tranne un settore per il confort termico dove era presente un pannello riscaldato. Gli animali sono stati sottoposti in modo casuale a quattro diverse tipologie di dieta, isoenergetiche e isoproteiche. Ogni dieta presentava quattro repliche, per un totale di 16 box. Oltre alla dieta di controllo senza farina di HI le altre 3 diete avevano una differente percentuale di inclusione di farina di HI, ovvero dieta con inclusione di farina di HI del 3%; HI6: dieta con inclusione di farina di HI del 6%; HI9: dieta con inclusione di farina di HI del 9%. La frazione di farina di larve di HI nelle diverse diete sperimentali ha sostituito parzialmente la farina di soia e la farina di pesce normalmente utilizzate nelle diete degli allevamenti suinicoli. La farina di larve di HI utilizzata nella prova sperimentale è stata fornita dall'azienda MUTATEC (1998, Chemin du Mitan, Cavaillon, FR). L'analisi centesimale della farina di larve di HI utilizzata era la seguente: SS 97.32%, PG 57.37%, Lipidi 7.33%, Ceneri 9.68%. Per rispettare le curve di crescita e i fabbisogni degli animali, la prova è stata suddivisa in tre periodi di alimentazione: fase 1 da 6 a 10 kg (T1); fase 2 da 11 a 20 kg (T2); fase 3 da 21 a 30 kg (T3). Il primo periodo ha avuto una durata di 13 giorni, il secondo periodo ha avuto una durata di 16 giorni e il terzo periodo è durato 34 giorni. Nell'ultimo

giorno di prova non è stato somministrato mangime. Al termine della prova una parte dei suini è stata macellata per indagini sulla morfologia dei villi intestinali e sul microbioma. Il mangime è stato fornito in forma pellettata in sacchi da 25 kg ciascuno. Ogni sacco è stato pesato e registrato e il mangime è stato somministrato agli animali manualmente. I suinetti sono stati monitorati quotidianamente e gli animali in evidente stato di difficoltà sono stati rimossi dalla prova. Al momento dell'allontanamento dalla prova, i suinetti debilitati sono stati pesati, allo stesso modo anche i suinetti morti sono stati pesati.

Performance di crescita

I dati necessari al calcolo dell'incremento medio ponderale (IMP), all'incremento medio giornaliero (IMG), all'assunzione media giornaliera di mangime (AMG) e all'indice di conversione alimentare (ICA) sono stati registrati quotidianamente e alla fine di ogni periodo di alimentazione. L'incremento di peso è stato calcolato alla fine di ognuna delle tre fasi. L'IMG è stato calcolato dividendo l'incremento di ogni fase per i giorni di alimentazione. L'AMG di mangime è stata calcolata dividendo il quantitativo di mangime consumato per i giorni di alimentazione. L'ICA è stato calcolato dividendo il quantitativo di mangime consumato per l'incremento di peso dei suini in ogni fase di alimentazione. Per il calcolo della mortalità si è tenuto conto soltanto dei suinetti effettivamente deceduti e non dei suinetti distolti.

Determinazione della digeribilità dei nutrienti

Al fine di determinare i coefficienti apparenti di digeribilità (Apparent Total Tract Digestibility Coefficient - CATTD) dei principi nutritivi, ciascun mangime è stato addizionato con l'1% di terre di diatomee quale marcatore indigeribile. A tale scopo, negli ultimi cinque giorni di ogni fase di alimentazione sono stati prelevati dei campioni di feci da ogni box, in due momenti distinti della giornata (un campionamento al mattino e uno al pomeriggio). I campioni sono stati congelati subito dopo la raccolta. I campioni di feci sono stati liofilizzati e utilizzati per le analisi centesimali: sostanza secca, proteine, estratti eterei e ceneri. La digeribilità dei nutrienti è stata calcolata come segue (Biasato et al.,2019): Digeribilità (%): 100 - [100 × (Nf × Td) / (Nd × Tf)] dove: - Nf e Nd sono rispettivamente le concentrazioni di nutrienti (in percentuale sulla sostanza secca) nelle feci e nella dieta, - Td e Tf sono le concentrazioni di terre di diatomee (in percentuale sulla sostanza secca) nelle diverse diete e nelle feci rispettivamente.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software IBM SPSS Statistics v. 26.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Il test di Shapiro-Wilk è stato utilizzato per verificare la normalità dei dati raccolti. L'ipotesi di omoschedasticità è stata valutata mediante il test di omogeneità della varianza di Levene. I dati sono stati successivamente analizzati mediante test di ANOVA a una via con post-test di Duncan. I risultati sono stati espressi come media ed errore 37 standard della media cumulativa (SEM). Valori di $P \leq 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Performance

Nel primo periodo di alimentazione l'IPG e l'AMG non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra le diete ($P>0.05$). Al contrario la dieta HI9 ha mostrato un ICA più elevato rispetto alla dieta di controllo ($P<0.05$) mentre le diete HI3 e HI6 non hanno

mostrato differenze significative tra loro (P>0.05; ICA Controllo 0,81; HI3 1,07; HI6 1,05; HI9 1,32).
Nel secondo periodo la dieta HI3 ha mostrato un ICA più elevato rispetto alla dieta HI9 (P<0.05) mentre le altre diete non hanno mostrato differenze significative tra loro (P>0.05; ICA Controllo 2,67; HI3 3,23; HI6 2,13; HI9 1,77). L'IPG della dieta HI3 (P<0.05) ha mostrato differenze significative rispetto alla dieta HI9, quest'ultima ha ottenuto il risultato migliore in termini di incremento ponderale. Le diete di controllo e HI6 non hanno mostrato differenze significative tra loro (P>0.05; IPG Controllo 0,16; HI3 0,13; HI6 0,20; HI9 0,23).
Nel terzo periodo l'ICA della dieta HI3 è risultato il migliore essendo minore rispetto alla dieta di controllo (P<0.05), mentre le diete HI6 e HI9 non hanno mostrato differenze significative (P>0.05; ICA Controllo 1,68; HI3 1,55; HI6 1,60; HI9 1,58). I paramenti IPG e AMG non sono risultati statisticamente significativi (P>0.05). Analizzando complessivamente i dati l'inclusione di farina di HI nella dieta non ha influenzato in modo significativo i parametri di IPG, AMG e ICA. Allo stesso modo l'inclusione di farina di HI nella dieta non ha influenzato in modo significativo la mortalità tra i quattro differenti gruppi (P>0,05).

Digeribilità
Nel primo periodo si sono riscontrate differenze significative nella digeribilità di tutte e tre le componenti: SS, PG e EE. La SS ha mostrato differenze significative tra la dieta di controllo e la dieta HI6, che ha registrato una digeribilità maggiore (P<0.05; SS Controllo 93,52%; HI3 93,74%; HI6 94,45%; HI9 94,11%). La digeribilità della PG è risultata essere maggiore nella dieta HI6 e HI9 rispetto a quella di C e HI3 (P<0,01 e P<0,001; PG Controllo 76,31%; HI3 76,18%; HI6 79,85%; HI9 80,28%).
La digeribilità dell'EE è risultata essere maggiore nella dieta HI6 e HI9 rispetto a quella di C e HI3 (P<0,01 e P<0,001): EE (%) Controllo 68,01a; HI3 68,80a; HI6 80,02b; HI9 80,16b.
Nel secondo periodo di alimentazione si sono registrate differenze significative soltanto per la digeribilità dell'EE, con una differenza tra la dieta di controllo e le diete HI3, HI6 e HI9: tra le tre diete, le migliori sono state HI6 e HI9 (P<0,001; EE Controllo 75,97%; HI3 79,79%; HI6 84,46%; HI9 85,05%). Per la SS e la PG non ci sono state differenze statisticamente significative (P<0,05).
Nel terzo periodo, le tre componenti hanno mostrato differenze significative tra le diete. Per la SS, la dieta di controllo ha mostrato una digeribilità maggiore rispetto alle altre diete (P<0.001). Tra le diete sperimentali a base di insetto invece non si sono registrate differenze significative (P>0.05; SS Controllo 94,77%; HI3 93,86%; HI6 93,62%; HI9 94,17%). Per la PG, la dieta di controllo è risultata caratterizzata da una digeribilità maggiore rispetto alle diete HI3 e HI6 (P=0,001), ma simile alla dieta HI9 (P>0,05; PG Controllo 81,55%; HI3 78,83%; HI6 78,06%; HI9 80,80%). L'EE ha mostrato una digeribilità migliore nella dieta HI9 rispetto agli altri trattamenti sperimentali (P<0.001). La dieta HI3 inoltre è risultata anche essere caratterizzata da una digeribilità minore rispetto alle diete C e HI6 (P<0,001; EE Controllo 79,24%; HI3 74,08%; HI6 77,92%; HI9 82,56%).

DISCUSSIONE
Ad oggi, non sono molti gli studi che hanno indagato gli effetti sulle performances e sulla digeribilità delle farine di HI nella dieta dei suinetti nella fase post-svezzamento e in letteratura non sono presenti molte informazioni sul livello di inclusione ideale di farina di insetto. Complessivamente nel seguente studio l'inclusione di farina di larve di HI nella dieta dei suinetti svezzati non ha influenzato in modo significativo i parametri di crescita (PV, IPG, AMG), per cui non si sono verificati dei cambiamenti considerevoli nelle performances dei suinetti. Ciò risulta coerente con gli studi di Spranghers et al., (2019), Biasato et al.,

(2019) e Driemeyer et al., (2016), che hanno evidenziato come la farina di insetto all'interno della dieta dei suini non influenzi le prestazioni di crescita degli animali. Il risultato è in accordo anche con lo studio di Spranghers et al. (2018) che non ha mostrato differenze nelle performance dei suinetti svezzati alimentati con HI con un livello di inclusione fino all'8%. Tuttavia l'ICA è variato in maniera significativa in tutte le fasi di alimentazione, mentre l'IPG ha mostrato differenze significative soltanto nel secondo periodo. Nel presente studio, si è osservato un incremento dell'ICA con l'aumento dell'inclusione di HI nella prima fase di alimentazione, corrispondente ai primi 14 giorni post-svezzamento.

In particolare, nel primo periodo di alimentazione, l'ICA della dieta HI9 è risultato essere maggiore all'ICA della dieta di controllo, mentre le diete HI3 e HI6 non hanno mostrato differenze significative tra loro. Questi risultati sono in parte coerenti con quelli di Yu et al. (2020) che hanno riportato un miglioramento lineare sia dell'IPG che dell'ICA soltanto quando l'inclusione di HI è aumentata dallo 0 al 4% nelle prime due settimane di post svezzamento. Quanto osservato nel presente studio potrebbe essere dovuto al fatto che i suinetti, abituati al mangime presente in sala parto, abbiano accettato meglio la dieta di controllo e rifiutato, almeno nei primi giorni di dieta, il mangime sperimentale. Al contrario, nel secondo periodo, l'ICA della dieta HI3 è risultato maggiore rispetto alla dieta HI9. Anche l'IPG del secondo periodo è stato a favore della dieta HI9, che ha mostrato differenze significative rispetto alla sola dieta HI3. Questo risultato potrebbe essere dovuto alla migliore appetibilità del mangime HI9, ovvero la dieta con il maggior contenuto di farina di HI, come già mostrato dallo studio di Jin et al. (2016). L'ICA del terzo periodo è stato invece migliore per la dieta HI3, che ha mostrato differenze significative rispetto alla dieta di controllo. Tali risultati concordano con lo studio di Yu et al. (2020), che hanno dimostrato che la somministrazione di farina di larve di HI al 2% ai suinetti può avere un effetto positivo sulle prestazioni di crescita. La differenza verificatasi tra il secondo e terzo periodo potrebbe essere dovuta alle diverse esigenze dei suini; nel secondo periodo i suinetti potrebbero avere avuto la necessità di assumere più mangime per soddisfare i fabbisogni di crescita. La dieta HI9, essendo più appetibile, potrebbe aver invogliato i suinetti a mangiare quantitativi maggiori di mangime andando ad incidere positivamente sull'ICA e anche sull'IPG. Generalmente, le prestazioni di crescita di suini alimentati con diete alternative contenenti farina di insetto risultano essere molto eterogenee (Gasco et al., 2019). Ciò può essere dovuto alla diversa tipologia di farina utilizzata, alla diversa specie impiegata, allo stadio di vita e sviluppo dell'insetto, dal substrato e dalla tecnica di lavorazione del prodotto fresco (Sanchez ́-Muros et al., 2015).

La letteratura non fornisce molte informazioni sulla digeribilità dei nutrienti delle farine di insetto e solo alcuni studi hanno preso in considerazione HI. Nel presente studio la farina di HI ha influenzato la digeribilità dei nutrienti. In particolare la SS ha mostrato differenze significative tra la sola dieta di controllo e la dieta HI6, che ha registrato una digeribilità maggiore. L'EE ha mostrato una differenza altamente significativa tra la dieta di controllo e HI3 rispetto alle diete HI6 e HI9, queste ultime decisamente migliori. La digeribilità della PG è stata maggiore nella dieta HI9, che ha mostrato differenze significative rispetto alle diete C e HI3, mentre non ci sono state differenze con la dieta HI6. Questi risultati concordano in parte con quanto studiato da Newton et al. (1977), che hanno riportato una minore digeribilità della sostanza secca e una maggiore digeribilità dei lipidi nei suinetti alimentati con il 33% di farina di larve di HI essiccate rispetto a quelli alimentati con farina di soia, sebbene la digeribilità della proteina grezza fosse simile. Al contrario di quanto riportato da Newton et al. (1977) in relazione alla digeribilità delle proteine, nel presente studio la digeribilità di PG è risultata maggiore nelle diete HI6 e HI9 rispetto a quella di controllo e HI3. Quanto osservato risulta maggiormente simile a quanto riportato da Yu et al. (2020), i quali hanno riscontrato una minor digeribilità della PG quando sono state incluse basse quantità di HI

(<4%). Nel complesso, i risultati hanno mostrato una migliore digeribilità dei nutrienti e ciò può essere legata alla capacità specie-specifica di digestione della chitina posseduta dai suini, che si manifesta con un'elevata distribuzione, attività e selezione positiva dei geni della chitinasi da parte dell'organismo suino (Biasato et al. 2019). Così come per le performance, anche la digeribilità dei nutrienti è influenzata dalla tipologia di materia prima impiegata e dal trattamento che subisce. Inoltre è da sottolineare che gli ingredienti dei mangimi utilizzati nelle diverse prove sono molto diversi tra loro e spesso le formulazioni sono coperte dal segreto commerciale, per cui questa condizione non permette di giungere a conclusioni attendibili sull'effettivo ruolo che HI ricopre nella digeribilità dei nutrienti.
In conclusione il presente studio ha dimostrato che un livello di inclusione fino al 9% di farina di larve di HI nelle diete di suinetti in post-svezzamento può essere una valida alternativa proteica ed energetica per la dieta, senza che essa alteri in modo negativo le performance di crescita e la digeribilità dei nutrienti. Tuttavia l'argomento non è stato ancora approfondito, per cui si necessitano altri studi che indaghino gli effetti dell'inclusione di farina di insetto nell'alimentazione dei suinetti nella fase post-svezzamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Biasato, I., Renna, M., Gai, F., Dabbou, S., Meneguz, M., Perona, G.,Martinez S., Barroeta Lajusticia A. C., Bergagna S., Sardi L., Capucchio M. T., Bressan E., Dama A., Schivone A. & Gasco, L. (2019). Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: effects on the growth performance, 48 nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features. Journal of animal science and biotechnology, 10, 1-11.
2. Chia, S. Y., Tanga, C. M., Osuga, I. M., Alaru, A. O., Mwangi, D. M., Githinji, M., Dubois T., Ekesi S., van Loon J.J.A. & Dicke, M. (2021). Black soldier fly larval meal in feed enhances growth performance, carcass yield and meat quality of finishing pigs. Journal of Insects as Food and Feed, 7(4), 433-447.
3. Driemeyer, H. (2016). Evaluation of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae as an alternative protein source in pig creep diets in relation to production, blood and manure microbiology parameters (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).
4. Gasco, L., Biasato, I., Dabbou, S., Schiavone, A., & Gai, F. (2019). Animals fed insect-based diets: State-of-the-art on digestibility, performance and product quality. Animals, 9(4), 170.
5. Janssen, R. H., Vincken, J. P., van den Broek, L. A., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. (2017). Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: Tenebrio molitor, Alphitobius diaperinus, and Hermetia illucens. Journal of agricultural and food chemistry, 65(11), 2275-2278.
6. Ji, Y. J., Liu, H. N., Kong, X. F., Blachier, F., Geng, M. M., Liu, Y. Y., & Yin, Y. L. (2016). Use of insect powder as a source of dietary protein in early-weaned piglets. Journal of Animal Science, 94(suppl_3), 111-116.
7. Jin, X. H., Heo, P. S., Hong, J. S., Kim, N. J., & Kim, Y. Y. (2016). Supplementation of dried mealworm (Tenebrio molitor larva) on growth performance, nutrient digestibility and blood profiles in weaning pigs. AsianAustralasian Journal of Animal Sciences, 29(7), 979.
8. Khempaka, S., Mochizuki, M., Koh, K., & Karasawa, Y. (2006). Effect of chitin in shrimp meal on growth performance and digestibility in growing broilers. The Journal of Poultry Science, 43(4), 339-343.
9. Kouřimská, L., & Adámková, A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. NFS journal, 4, 22-26. 51
10. Lassaletta, L., Estellés, F., Beusen, A. H., Bouwman, L., Calvet, S., Van Grinsven,

H. J., Doelman J. C., Stehfest E., Uwizeye A., Westhoek H. (2019). Future global pig production systems according to the Shared Socioeconomic Pathways. Science of the Total Environment, 665, 739-751.f

11. Liu, C., Masri, J., Perez, V., Maya, C., & Zhao, J. (2020). Growth performance and nutrient composition of mealworms (Tenebrio molitor) fed on fresh plant materials-supplemented diets. Foods, 9(2), 151.
12. Makkar, H. P., Tran, G., Heuzé, V., & Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. Animal feed science and technology, 197, 1-33.
13. Newton, G.L., Booram, C.V., Barker, R.W., & Hale, O.M. (1977). Dried Hermetia illucens larvae meal as a supplement for swine. Journal of Animal Science, 44(3), 395-400.
14. Newton L., Sheppard C., Watson D.W., Burtle, G., & Dove R., (2005). Using the black soldier fly, Hermetia illucens, as a value-added tool for the management of swine manure. Animal and Poultry Waste Management Center, North Carolina State University, Raleigh, NC, 17(2005), 18. - Oecd-Fao Agricultural Outlook 2020-2029 - Oecd-Fao Agricultural Outlook 2022–2031.
15. Oonincx, D. G., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., & van Loon, J. J. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. PloS one, 10(12), e0144601.
16. Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. Journal of Cleaner Production, 65, 16-27.
17. Spranghers, T., Michiels, J., Vrancx, J., Ovyn, A., Eeckhout, M., De Clercq, P., & De Smet S. (2018). Gut antimicrobial effects and nutritional value of black soldier fly (Hermetia illucens L.) prepupae for weaned piglets. Animal Feed Science and Technology, 235, 33-42.
18. Spranghers, T., Ottoboni, M., Klootwijk, C., Ovyn, A., Deboosere, S., De Meulenaer, B., Michiels J., Eeckhout M., De Clercq P. & De Smet S. (2017). Nutritional composition of black soldier fly (Hermetia illucens) prepupae reared 54 on different organic waste substrates. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(8), 2594-2600.
19. Van Huis A., (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annual review of entomology, 58, 563-583. - Veldkamp, T., & Bosch G. (2015). Insects: a protein-rich feed ingredient in pig and poultry diets. Animal Frontiers, 5(2), 45-50.
20. Yu M., Li Z., Chen W., Rong T., Wang G., Wang, F., & Ma, X. (2020). Evaluation of full-fat Hermetia illucens larvae meal as a fishmeal replacement for weanling piglets: Effects on the growth performance, apparent nutrient digestibility, blood parameters and gut morphology. Animal Feed Science and Technology, 264, 114431.

EFFETTO DELLA PARZIALE SOSTITUZIONE DELLA SOIA E DELLA RIDUZIONE DELLA QUOTA PROTEICA SULLE PERFORMANCE DI SUINI NELLA FASE D'INGRASSO

EFFECT OF SOYBEAN AND CRUDE PROTEIN REDUCTION ON THE PERFORMANCE OF GROWING PIGS

GRAZIOSI M.V.[1], LUISE D.[1], SOGLIA F.[1], CORREA F.[1], VIRDIS S.[1], NEGRINI C.[1], PALUMBO F.[1], CAU F.[2], SERENI M.[2], ROLLA U.[2], BIAGI G.[3], PETRACCI M.[1], TREVISI P.[1]

[1]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari (DISTAL), Università di Bologna; [2]Martini Spa; [3]Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET), Università di Bologna

Parole chiave: dieta sostenibile, ingrasso, fonti proteiche alternative
***Keywords*:** sustainable diet, fattening pigs, Alternative protein sources

Riassunto
L'uso di farina di soia importata, contribuisce all'impatto ambientale della filiera suinicola nazionale. Lo studio ha valutato la parziale sostituzione della soia con fonti proteiche di provenienza UE e la riduzione di proteina grezza negli ultimi tre mesi di allevamento sulle performance, la salute ed il benessere di suini in ingrasso. All'accasamento, 1930 suini sono stati divisi in: i. gruppo controllo (CO), alimentato con una comune dieta da ingrasso; ii. gruppo trattato (TRT), alimentato con una dieta a basso contenuto di soia (- ~56%). Su un campione di 251 animali è stato registrato il peso vivo (PV) individuale ed il consumo alimentare, usati per il calcolo dell'incremento ponderale giornaliero (IPG) e la resa alimentare (RA). Indici di benessere sono stati monitorati mensilmente. 20 campioni di feci/gruppo sono stati raccolti per quantificare la concentrazione di NH_3. Al termine della prova gli animali sono stati macellati e le caratteristiche della carcassa sono state esaminate. È stato adottato un Linear mixed model (dieta e sesso: fattori fissi; box: fattore casuale). Il gruppo TRT, mostra un migliore IPG rispetto al gruppo CO (P = 0.01) ed una migliore RA (P = 0.01). L'NH_3 fecale non è stata influenzata dalla dieta così come i parametri della carcassa. Dunque, la sostituzione di soia può essere una strategia promettente nella formulazione delle diete per suini in ingrasso, così come la restrizione proteica non compromette salute e performance dei suini.

Abstract
The use of imported soybean meal contributes to the environmental impact of the national pig supply chain. The study evaluated the partial replacement of soybean by EU protein sources and the reduction of crude protein during the last three months of rearing on the performance, health and welfare of fattening pigs. At housing, 1930 pigs were divided into: i. control group (CO), fed a common fattening diet; ii. treated group (TRT), fed a low soy diet (- ~56%). In a sample of 251 animals, individual body weight (BW) and average daily feed intake (ADFI) were recorded and used for calculations of average daily gain (ADG) and gain to feed ratio (G:F). Welfare indices were monitored monthly. 20 faecal samples/group were collected to quantify the NH_3 concentration. At the end of the trial the animals were slaughtered and the carcass characteristics examined. A Linear mixed model was adopted (diet and sex: fixed factors; box: random factor). The TRT group showed a better ADG than the CO group (P =

0.01) and a better G:F (P = 0.01). Faecal NH_3 was not influenced by the diet as well as carcass parameters. Thus, soybean meal substitution may be a promising strategy in formulating diets for fattening pigs, just as protein restriction does not compromise pig health and performance.

INTRODUZIONE

Per la suinicoltura, la sostenibilità ambientale e la riduzione delle emissioni rappresentano un'importante obiettivo strategico per il mantenimento della competitività del settore. Di certo l'alimentazione è uno dei fattori determinanti in questo percorso. Infatti, il mangime è indicato come il principale responsabile degli impatti ambientali nella produzione di carne suina (Reckmann et al., 2016). Dunque, vi è la necessità di studiare formule che integrano materie prime a minore impatto ambientale. Nelle formule da ingrasso la principale fonte proteica è la soia, che viene integrata in media al 13% nella prima fase di alimentazione fino a scendere a circa l'8% nell'ultima fase di alimentazione. Ed è proprio agendo sul livello di inclusione di soia che si possono ottenere diete più sostenibili. Per contro si deve comunque considerare che la soia ed i suoi derivati rappresentano la più importante fonte proteica vegetale, grazie al suo buon profilo amminoacidico, alla bassa concentrazione di fibra e alla sua economicità rispetto ad altri concentrati proteici (Wang et al., 2011). Reckmann et al. (2016), hanno evidenziato la possibilità di sostituire parzialmente la soia utilizzando fonti proteiche locali il cui profilo amminoacidico può essere corretto con l'uso di aminoacidi di sintesi. Pare che ciò possa ridurre sensibilmente l'impatto ambientale delle formule. Nel suino, tra le materie prime autorizzate nei principali disciplinari DOP, il pisello ed il girasole sembrano essere le più interessanti, sia in termini nutrizionali sia di disponibilità. Per quel che riguarda il pisello, viene impiegato con cautela per i timori legati alla presenza di vari fattori anti-nutrizionali ed il basso contenuto in amminoacidi solforati (Hanczakowska e Świątkiewicz, 2014). Allo stesso modo, anche la farina di estrazione di girasole, rispetto a quella di soia, ha tipicamente contenuti inferiori di proteine e lisina digeribile e maggiore contenuto di fibra (Lannuzel et al., 2022). Come secondo fattore applicabile per ridurre l'impatto della dieta, vi è la riduzione della quota proteica, soprattutto nelle diete da ingrasso, a partire dai 100-120 kg di peso vivo, dove il fabbisogno proteico non è più così elevato. Questo approccio di formulazione deve essere impiegato con cautela, considerando le scarse conoscenze sui fabbisogni proteici e di Lisina delle moderne linee genetiche per il suino pesante.

Dunque, l'obiettivo di questa prova era quello di testare diete basate sul concetto della parziale sostituzione della soia con fonti proteiche locali (nazionali e/o comunitarie) da impiegare nella fase di ingrasso del suino pesante, rispettando le prescrizioni del disciplinare della DOP del prosciutto id Parma, valutandone quindi l'effetto sulle performance di crescita e sulla qualità organolettica e tecnologica della carne.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto nell'ambito del progetto PSR 2014-2020 Regione Emilia Romagna FOCUS AREA 3A- Misura 16.2.1 – GREEN SUINO. Per la prova sono stati accasati 1930 suini a coda lunga in un sito da ingrasso afferente al Gruppo Martini Spa. I suini sono stati divisi in: i. gruppo di controllo (CO): alimentato con la normale dieta formulata dal gruppo Martini per questa fase (930 suini; peso vivo medio 36,2 kg); ii. gruppo a basso contenuto di soia (TRT): in cui la soia è stata sostituita utilizzando materie prime caratterizzate da un minor impatto ambientale (1000 suini; peso vivo medio 35,0 kg), nella terza fase di alimentazioni la dieta TRT aveva un contenuto in CP inferiore dell'1,2% rispetto alla dieta CO, mentre il livello di Lisina era identico. La composizione chimica delle diete è riportata in **Tabella 1**. Ogni gruppo era formato da 48 box uguali (20.4 m2). Entrambi i capannoni presentavano un

sistema di ventilazione naturale. In ogni box erano presenti un tronchetto di legno morbido ed una catena in acciaio. I box presentavano pavimento in cemento completamente grigliato ed erano equipaggiati con un abbeveratoio a nipple ed una mangiatoia di lunghezza pari al lato lungo del box, che equivaleva a 0.40 m/suino di fronte mangiatoia. Il sistema di alimentazione a liquido era munito di valvole in grado di servire due box contigui. In virtù del sistema di distribuzione dell'alimento, per quanto riguarda il consumo alimentare e l'indice di conversione alimentare, due box adiacenti sono stati considerati come un'unità sperimentale, costituita dunque da 42 animali. Mentre, per gli altri parametri, l'unità sperimentale equivale al singolo box.
Trascorsi dieci giorni dall'accasamento, 251 suini (126 suini del gruppo CO e 125 suini del gruppo TRT) sono stati selezionati, contrassegnati con una marca auricolare numerata e pesati individualmente. Il peso è poi stato rilevato al d94 ed al d181 (prima del trasporto al macello) post-accasamento. Nelle stesse giornate di rilevamento del peso, da un ulteriore sottogruppo di 40 animali (20 suini/dieta) sono stati raccolti campioni di feci per la quantificazione di ammoniaca (Urea/BUN-Color; BioSystems S.A., Barcellona, Spagna). La mortalità e gli animali spostati in infermeria sono state registrata quotidianamente, mentre il consumo alimentare è stato registrato mensilmente. Inoltre, mensilmente, nei box con gli animali con marca auricolare, sono state valutate le lesioni a coda ed orecchie secondo il protocollo Welfare Quality®, ed i risultati sono stati espressi come indice di punteggio delle lesioni (LSI), che considera sia la frequenza sia la gravità delle lesioni. I rilievi comportamentali sono stati effettuati sempre tra le 8:00 e le 11:00 del mattino, mediante l'osservazione diretta di tutti gli animali in ogni box. L'osservazione è stata effettuata cinque volte per ogni box, con due minuti di pausa tra un'osservazione e l'altra. Le osservazioni erano volte a raggruppare tutti gli animali presenti nel box sulla base del comportamento esibito secondo le prescrizioni del protocollo Welfare Quality (2009).
Al termine della fase di ingrasso, trascorsi 182 giorni dall'accasamento, i suini sono stati macellati nello stabilimento del gruppo Martini; in uscita, il peso medio degli animali era pari a 171.1 kg e 170.1 kg rispettivamente per CO e TRT. Durante la macellazione sono stati raccolti i parametri di qualità della carcassa: la marca auricolare ha permesso di collegare il dato rilevato dal FOM (Fat O'Meter) con i rilevamenti eseguiti in allevamento per ogni soggetto, inoltre, dagli stessi soggetti da cui erano state campionate le feci è stato prelevato un campione di L. *lumborum* per l'analisi degli acidi grassi.
Analisi statistiche e descrittive sono state effettate tramite l'utilizzo del software R. I dati riportati sono stati analizzati tramite la funzione "lmer" del pacchetto lme4 ed utilizzando un modello cosiddetto "linear mixed-effects". I fattori fissi considerati sono stati il trattamento dietetico ed il sesso, mentre il fattore random è stato il box.

RISULTATI

In **Tabella 2** sono riportati i dati riferiti alle prestazioni di crescita dei suini selezionati. La dieta non ha influenzato il peso degli animali in prova in nessuno dei tre rilevamenti. A differenza del sesso che ha un effetto significativo (P=0.002), sempre a favore dei maschi. La dieta TRT ha migliorato in modo significativo La l'IPG, nel periodo d94-d181 (P=0.01) così come nell'intero periodo di prova (d11-d18) (P=0.04). Come per il peso, anche l'IPG è risultato maggiore nei maschi (P=0.01).
In **Tabella 3** sono riportati i dati riferiti al consumo di alimento, all'efficienza alimentare ed al numero di soggetti esclusi dalla prova per mortalità o spostamento in infermeria. I suini del gruppo TRT hanno mostrato un consumo alimentare maggiore durante i primi due periodi di alimentazioni rispetto al gruppo CO (P=0.004). Mentre nella terza ed ultima fase di alimentazione l'ingestione è stata superiore nel gruppo CO (P<0.0001).

Per quanto riguarda la RA, il gruppo TRT ha mostrato un dato migliore in tutti i periodi considerati (P=0.007, P=0.001, P=0.01).
Il dato di mortalità ed esclusione non mostra differenze significative tra le diete.
In **Tabella 4** è riportata la concentrazione di ammoniaca (NH_3) presente nelle feci campionate al d11 e al d181. Ad inizio ciclo il fattore che ha influenzato questo parametro è il sesso, mentre la dieta non ha alcun effetto (P=0.01). Di fatto i maschi hanno mostrato una concentrazione di ammoniaca nelle feci più alta. Per quel che riguarda il secondo campionamento al d181, non sono state riscontrate differenze significative né legate alla dieta, né al sesso.
In **Tabella 5** sono riportati i parametri di comportamento e di salute rilevati in allevamento. Al d34 il gruppo CO ha tendenzialmente ridotto il valore di LSI orecchie (P=0.06) che di fatto si traduce in una minore prevalenza/gravità delle lesioni alle orecchie. Al contrario il gruppo TRT presenta un LSI della coda inferiore (P=0.07), questo dato si è confermato al d102 in cui il gruppo TRT ha un LSI code inferiore rispetto al gruppo CO (P=0.03). In tutti gli altri rilevamenti non sono state evidenziate differenze tra i due gruppi. Relativamente ai parametri comportamentali, al d11 gli animali del gruppo CO hanno mostrato una maggiore attività di esplorazione del materiale manipolabile (P<0.01). A fine prova (d138) il gruppo TRT ha mostrato maggiori interazioni sociali positive (P=0.04), mentre il gruppo CO ha teso a mantenere una maggiore attività di esplorazione del materiale manipolabile (P=0.08). I risultati non mostrano altre differenze significative per gli indici di comportamento e di salute.
Infine, in **Tabella 6** sono riportati i parametri registrati dal FOM. La dieta non ha influenzato nessuno dei parametri registrati. Mentre, la **Tabella 7** riporta i dati del grasso rilevati nel muscolo. Il gruppo TRT ha un maggiore tenore lipidico, mentre il profilo in acidi grassi non è stato influenzato dalla dieta.

DISCUSSIONE

Nonostante la sostenibilità sia un tema molto dibattuto, gli studi che hanno valutato diete con una forte restrizione dell'inclusione di soia nel suino pesante, sono limitati. In bibliografia sono presenti studi che hanno valutato separatamente l'impiego di pisello e farina di girasole, quali possibili alternative alla soia, riportando dati positivi sulle prestazioni di crescita dei suini. Il pisello, in particolare può essere impiegato nella dieta fino al 30%, senza effetti negativi sulle performance di crescita, richiedendo un attento bilanciamento del profilo aminoacidico delle diete (Degola and Jonkus, 2018; Lombardi et al., 2020; Argemí-Armengol, 2022). Per quanto riguarda la farina di girasole, la letteratura è controversa. Infatti, alcuni studi riportano un effetto negativo sulle performance di crescita dei suini, rispetto a diete a base di soia (Shelton et al., 2001), mentre altri studi non hanno riscontrano differenze significative (Cortamira et al., 2000; Trombetta and Mattii, 2016; Povod et al., 2021). La nostra ricerca conferma che l'inclusione di farina di girasole tra il 2.5 ed il 5% non compromette le prestazioni degli animali se le diete sono iso-amminoacidiche. In dettaglio, lo studio ha mostrato una flessione dell'IPG nel gruppo TRT nel periodo iniziale della prova (d11 - d94), nonostante un maggiore consumo di alimento. Questa discrepanza, rispetto al periodo successivo (d94 – d181) potrebbe essere attribuita allo stress iniziale tipicamente associato al periodo post accasamento (Kerr et al., 2005), determinato dalla maggiore difficoltà dei suini ad adattarsi ad una dieta a minore digeribilità. A parte la digeribilità, il cambio della dieta, può influenzare il comportamento degli animali, a causa della diversa cinetica digestiva che influenza il senso di sazietà. Tuttavia, in questo studio, nonostante il livello più elevato di fibra insolubile nel gruppo TRT la dieta ha marginalmente influenzato il comportamento degli animali. È stato osservato solo un effetto nell'ultima fase di alimentazione, con un minor LSI della coda e una maggiore incidenza di comportamenti positivi. Oltre alla sostituzione della fonte proteica, in

questo studio, nell'ultima fase di alimentazione (120-180 kg), le diete sono state differenziate per il livello proteico ma non per il livello di Lys. Ciò non ha influenzato le performance degli animali. Questi dati confermano quelli di Gallo et al. (2014) per il suino pesante italiano, dove per la stessa fase di crescita, hanno suggerito livelli proteici e Lys del 10,8% e 4,8 g/kg rispettivamente, evidenziando la possibilità di una maggiore restrizione dell'azoto dietetico nella dieta di finissaggio, anche in diete con una forte restrizione nell'inclusione della farina di soia. L'assenza dell'effetto della dieta, sulla concentrazione di NH_3 fecale durante tutta la prova non permette di trarre conclusioni sull'efficienza nella sintesi proteica dei suini, di fatto sarebbe utile includere altre misure dirette o indirette, come l'urea nelle urine e nel sangue. Per quanto riguarda i parametri rilevati al macello, la dieta non ha influenzato le caratteristiche della carcassa né il profilo acidico. Questi risultati sono in accordo con quanto emerso da altri studi (Stein et al., 2006; Chrenková et al., 2011). Questi, sostituendo la farina di soia con un 30% di farina di pisello non hanno evidenziato differenze significative per quel che riguarda la percentuale di grasso e magro della carcassa ed il profilo acidico. Allo stesso modo, Carrellos et al. (2005) e Shelton et al. (2001) utilizzando livelli d'inclusione diversi di farina di girasole non hanno evidenziato effetti negativi sui parametri di qualità della carcassa, riportando quindi esiti sovrapponibili a quelli del presente studio. Anche le differenze riscontrate nel nostro studio e legate al sesso degli animali sono coerenti con quelli di studi precedenti. Infatti, anche Stein e colleghi (2006) hanno riportato una quota maggiore di grasso negli animali di sesso maschile.

CONCLUSIONI

In conclusione, i dati raccolti mostrano che la sostituzione media del 56% di soia, attraverso l'uso di materie prime più sostenibili come la farina di piselli e di girasole può essere considerato nella formulazione delle diete per suini in ingrasso. Inoltre, negli ultimi tre mesi di allevamento si dovrebbe riconsiderare il livello proteico delle formule. Un altro aspetto importante da considerare è sicuramente il costo formula, che comunque va commisurato ai vantaggi in termini di performance e di benessere che abbiamo osservato nel corso dello studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Argemí-Armengol, I., Villalba, D., Vall, L., Coma, R., Roma, J., Álvarez-Rodríguez, J., (2022). Locally Grown Crops and Immunocastration in Fattening Heavy Pigs: Effects on Performance and Welfare. Animals 12, 1629.
2. Chrenková, M., Formelová, Z., Chrastinová, Ľ., Fľak, P., Čerešňáková, Z., Lahučký, R., Poláčiková, M., Bahelka, I., (2011). Influence of diets containing raw or extruded peas instead of soybean meal on meat quality characteristics in growing-finishing pigs. Czech J. Anim. Sci. 56, 119–126.
3. Cortamira, O., Gallego, A., Kim, S.W., (2000). Evaluation of Twice Decorticated Sunflower Meal as a Protein Source Compared with Soybean Meal in Pig Diets. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 13, 1296–1303.
4. Degola, L., Jonkus, D., (2018). The influence of dietary inclusion of peas, faba bean and lupin as a replacement for soybean meal on pig performance and carcass traits. Agron. Res. 16(2), 389-397.
5. Gallo, L, Dalla Montà, G., Carraro, L., Cecchinato, A., Carnier, P., Schiavon, S. (2014). Growth performance of heavy pigs fed restrictively diets with decreasing crude protein and indispensable amino acids content, Livest Sci. 161:130-138.
6. Hanczakowska, E., Świątkiewicz, M., (2014). Legume Seeds and Rapeseed Press Cake as Replacers of Soybean Meal in Feed for Fattening Pigs. Annals of Animal Science 14,

921–934.
7. Kohn RA, Dinneen MM and Russek-Cohen E (2005). Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats1. J. Anim. Sci. 83, 879–889.
8. Lannuzel, C., Smith, A., Mary, A.L., Della Pia, E.A., Kabel, M.A., de Vries, S., (2022). Improving fiber utilization from rapeseed and sunflower seed meals to substitute soybean meal in pig and chicken diets: A review. Anim. Feed Sci Technol. 285, 115213.
9. Lombardi, P., Musco, N., Calabrò, S., Tudisco, R., Mastellone, V., Vastolo, A., Infascelli, F., Cutrignelli, M.I., (2020). Different carbohydrate sources affect swine performance and post-prandial glycaemic response. Ital. J. Anim. Sci. 19, 421–430.
10. Munsterhjelm, C., Brunberg, E., Heinonen, M., Keeling, L., Valros, A., (2013). Stress measures in tail biters and bitten pigs in a matched case-control study. Animal Welfare 22, 331–338.
11. Povod, M.G., Mikhalko, O.G., Shpetny, M.B., Opara, V.O., (2021), Productive qualities of fattening young pigs at different levels of protein in the diet. Bulletin of the Sumy National Agrarian University 3(46),79–84.
12. Reckmann, K., Blank, R., Traulsen, I., Krieter, J., (2016). Comparative life cycle assessment (LCA) of pork using different protein sources in pig feed. Arch. Anim. Breed. 59, 27–36.
13. Schrøder-Petersen, D.L., Simonsen, H.B., (2001). Tail Biting in Pigs. Vet J. 162, 196–210.
14. Shelton, J.L., Hemann, M.D., Strode, R.M., Brashear, G.L., Ellis, M., McKeith, F.K., Bidner, T.D., Southern, L.L., (2001). Effect of different protein sources on growth and carcass traits in growing-finishing pigs. J Anim Sci. 79, 2428–2435.
15. Stein, H.H., Everts, A.K.R., Sweeter, K.K., Peters, D.N., Maddock, R.J., Wulf, D.M., Pedersen, C., (2006). The influence of dietary field peas (Pisum sativum L.) on pig performance, carcass quality, and the palatability of pork. J Anim Sci. 84, 3110–3117.
16. Trombetta, M.F., Mattii, S., (2005). Sunflower expeller vs. soya meal in heavy pig production: performance and digestibility. Ital J Anim Sci. 4, 461–463.
17. Wang, J. P., Hong, S. M., Yan, L., Cho, J. H., Lee, H. S., Kim, I. H., (2011). The evaluation of soybean meals from 3 major soybean-producing countries on productive performance and feeding value of pig diets. J Anim Sci, 89(9), 2768-2773.
18. Wang, Y.M., Yu, H.T., Zhou, J.Y., Zeng, X.F., Wang, G., Cai, S., Huang, S., Zhu, Z.P., Tan, J.J., Johnston, L.J., Levesque, C.L., Qiao, S.Y., (2019). Effects of feeding growing-finishing pigs with low crude protein diets on growth performance, carcass characteristics, meat quality and nutrient digestibility in different areas of China. Anim Feed Sci Technol 256, 114256.
19. Wilke, V., Gickel, J., Visscher, C., (2023). Monitoring of Performance-Based Environmental Impacts of Substituting Soybean Meal with Rapeseed Meal in the Rye-Based Diet of Weaned Pigs. Sustainability 15, 2210.

Tabella 1. Ingredienti e composizione chimica delle diete.
Table 1. Composition and analysed chemical composition of the diets.

	Fase 1 d0-d28		**Fase 2** d29-d94		**Fase 3** d95-d184	
	CO	**TRT**	**CO**	**TRT**	**CO**	**TRT**
Ingredienti, %						
Orzo	34.11	27.50	18.00	10.00	25.00	22.50
Grano	14.28	20.00	0.00	19.17	0.00	13.63
Mais	16.00	18.47	35.11	15.00	30.35	34.93
Farina di soia 48	12.15	8.33	10.83	3.50	8.00	2.50
Mais premacinato	8.00	8.00	8.00	7.67	19.25	12.50
Pisello	0.00	5.50	1,67	5.00	4.42	5.00
Farina di girasole	0.00	2.92	0.00	5.00	0.00	2.50
Farinaccio	0.00	0.00	5.00	5.03	4.85	0.00
Crusca	1.67	0.00	1.33	0.00	2.17	0.00
Triticale	3.75	0.00	10.00	0.00	0.00	0.00
Sorgo bianco	0.00	0.00	0.00	20.50	0.00	0.00
Germe di mais	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00
Valina 96.5%	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Grassi misti	3.00	2.83	1.83	2.00	1.50	1.67
Polpe di bietola	3.30	2.50	5.50	2.50	2.50	2.50
Calcio carbonato	0.94	0.93	0.87	0.93	0.77	0.77
Sodio bicarbonato	0.00	0.00	0.55	0.50	0.58	0.47
Acido formico	0.83	0.83	0.00	0.00	0.00	0.00
Lisina liquida 50%	0.62	0.67	0.44	0.66	0.18	0.40
Cloruro di sodio	0.43	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00
1540GE INT SUINI	0.25	0.25	0.25	0.25	0.20	0.20
ROVBIO ROVABIO AP/10	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.05
1 ALIME ALIMET MHA	0.00	0.00	0.07	0.07	0.00	0.00
Fosfato monocalcico	0.25	0.33	0.30	0.08	0.10	0.22
Treonina	0.14	0.16	0.10	0.13	0.01	0.06
2-hydroxy-4(methylthio) - HMB	0.12	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
Colina liquida 75%	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
HIPHOS 0-50	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05
HIPHOS 50-100	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
L-Triptofano	0.02	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
Real chemical composition						
Sostanza secca, g/g%	89.40	88.50	88.50	88.55	89.45	89.30
Proteina grezza, g/g%	13.90	13.69	13.12	13.20	12.54	11.30
Lipidi grezzi, g/g%	5.28	5.07	4.77	4.51	4.20	4.34
Fibra grezza, g/g%	3.63	3.94	3.68	4.19	3.78	3.74
Ceneri, g/g%	4.25	4.28	4.20	3.84	3.78	3.48
Amido, g/g%	44.00	44.81	46.14	48.13	50.05	52.89

Tabella 2. Effetto della dieta e del sesso sui parametri produttivi individuali dei suini in fase d'ingrasso
Table 2. Effect of the diet and sex on the growth of growing and finishing pigs.

[1]Parametro	Dieta		SEM	Sex		SEM	P-value	
	CO	TRT		F	M		Dieta	Sesso
Peso vivo, Kg								
d11	46.8	45.6	1.3	45.2	47.2	1.0	0.48	0.02
d94	124	121	2.1	119	126	1.7	0.33	0.0002
d181	177	180	1.55	175	182	1.5	0.26	0.002
Incremento ponderale giornaliero, g/giorno								
d11-d94	926	908	11	885	948	21	0.28	<0.0001
d94-d181	615	677	16.5	643	649	15.3	0.01	0.76
d11-d181	765	788	8	761	792	8.1	0.04	0.01

[1]Parametro: tutti i parametri descritti sono stati rilevati sugli animali con marca auricolare.

Tabella 3. Effetto della dieta sul consumo di alimento, l'efficienza alimentare ed il numero di soggetti esclusi dalla prova.
Table 3. Effect the diet on feed consumption, gain to feed, mortality and esclusion of growing and finishing pigs.

[1]Parametro	Dieta		SEM	P-value
	CO	TRT		Dieta
Consumo alimentare g/giorno				
d11-d94	2285	2328	5.95	0.004
d94-d181	2783	2566	12.2	<0.0001
d11-d181	2619	2525	7.89	<0.0001
Resa Alimentare				
d11-d94	0.41	0.39	0.003	0.007
d94-d181	0.224	0.263	0.005	0.001
d11-d181	0.295	0.312	0.004	0.01
Mortalità ed esclusione				
d11-d94	7.94	7.26	4.73	0.92
d11-d181	7.94	8.85	4.78	0.89

[1]Parametro: tutti i parametri descritti sono stati rilevati sugli animali con marca auricolare.

Tabella 4. Effetto della dieta e del sesso sulla concentrazione di ammoniaca nelle feci (micromoli/grammo).
Table 4. Effect the diet and sex on faecal ammonia concentration of growing and finishing pigs.

[1]Parametro	Dieta		SEM	Sesso		SEM	P-value	
	CO	TRT		F	M		Dieta	Sesso
NH_3 (micromoli/g)								
d11	32.5	35.9	5.34	27.4	41	4.6	0.66	0.01
d181	31	36	3.93	34	32.8	13.7	0.85	0.52

[1]Parametro: tutti i parametri descritti sono stati rilevati sul sottogruppo di 24 animali/gruppo.

Tabella 5. Effetto della dieta sugli indici di comportamento e di salute rilevate in allevamento.
Table 5. Effect the diet on behaviours and injuries' incidence of growing and finishing pigs.

[1]Parametro	Dieta		SEM	P-value
	CO	TRT		
d11				
Lesioni, n				
LSI orecchie	56.3	60.8	8.44	0.72
LSI coda	34.1	68.2	13.5	0.10
d34				
Comportamenti, %				
Riposo	40.6	53.8	5.89	0.15
Suzione	0.00	0.00	0.00	1.00
Interazioni positive	5.58	4.38	0.96	0.40
Interazioni negative	1.44	1.62	0.44	0.78
Esplorazione dell'arricchimento	7.56	1.99	1.22	<0.01
Esplorazione del box	43.8	34.3	7.02	0.36
Altri comportamenti	0.97	3.84	1.21	0.12
Lesioni, n				
LSI orecchie	59.2	91.1	10.9	0.06
LSI coda	55.3	22.9	11.6	0.07
d70				
Comportamenti, %				
Riposo	58.9	68.7	6.14	0.29
Suzione	0.16	0.88	0.39	0.22
Interazioni positive	2.54	3.81	1.45	0.55
Interazioni negative	3.13	0.99	0.98	0.16
Esplorazione dell'arricchimento	1.21	1.21	0.47	0.99
Esplorazione del box	23.4	18.4	4.13	0.42
Altri comportamenti	10.72	6.03	1.72	0.08
Lesioni, n				
LSI orecchie	69.3	74.6	6.95	0.60
LSI coda	5.74	6.03	2.56	0.93
d102				
Comportamenti, %				
Riposo	74.9	82.6	3.42	0.14
Suzione	0.17	0.79	0.46	0.35
Interazioni positive	4.92	3.12	1.04	0.25
Interazioni negative	0.89	0.89	0.52	0.99
Esplorazione dell'arricchimento	2.16	1.63	0.88	0.68
Esplorazione del box	12.2	7.5	2.48	0.21
Altri comportamenti	4.79	3.51	0.97	0.37
Lesioni, n				
LSI orecchie	56.5	41.7	7.24	0.17
LSI coda	29.9	15.8	3.89	0.03
d138				
Comportamenti, %				
Riposo	69.9	73.9	4.73	0.56
Suzione	0.16	0.00	0.11	0.34
Interazioni positive	0.79	5.26	1.36	0.04
Interazioni negative	1.33	2.03	1.40	0.73
Esplorazione dell'arricchimento	4.90	1.21	1.38	0.08
Esplorazione del box	12.96	9.55	1.95	0.24
Altri comportamenti	9.97	8.05	2.37	0.58
Lesioni, n				
LSI orecchie	72.9	63.9	10.2	0.55
LSI coda	26.2	26.2	2.63	0.98
d181				
Lesioni, n				
LSI orecchie	103	117	11.8	0.41
LSI coda	80.8	71.6	8.79	0.48

[1]Parametro: tutti i parametri descritti sono stati rilevati sugli animali con marca auricolare.

Tabella 6. Effetto della dieta sui parametri della carcassa al macello.
Table 6. Effect of the diet on carcass parameters of pigs.

[1]Parametro	Dieta		SEM	P-value
	CO	TRT		Dieta
Parametri della carcassa				
Peso Freddo	143	142	1.41	0.72
% UM	50.6	49.9	0.34	0.13
mm grasso	33.5	34.8	0.76	0.24
mm magro	65.0	65.9	0.38	0.12
Carcasse DOP, %	96.1	97.6	0.85	0.23

[1]Parametro: i parametri descritti sono stati rilevati su tutti gli animali in prova (891 animali del gruppo CO e 871 animali del gruppo TRT).

Tabella 7. Effetto della dieta sulla composizione lipidica del muscolo *longissimus lumborum.*
Table 7. Effect of the diet on the lipid composition of the *longissimus lumborum* muscle.

	Dieta		SEM	Sesso		SEM	P-value	
	CO	TRT		F	M		Dieta	Sesso
Grasso totale (g/100g)	2.45	2.85	0.29	2.24	3.12	0.29	0.37	0.02
Acidi grassi esterificati, %								
Acido arachidico	0.77	0.72	0.07	0.67	0.84	0.08	0.50	0.10
Acido laurico	0.45	0.74	0.17	0.53	0.64	0.13	0.22	0.39
Acido linoleico	0.82	0.82	0.08	0.73	0.91	0.08	0.97	0.10
Acido linolenico	0.67	0.59	0.05	0.59	0.68	0.05	0.23	0.25
Acido miristico	1.44	1.64	0.10	1.54	1.53	0.10	0.17	0.92
Acido oleico	37.5	37.4	0.48	37.6	37.3	0.47	0.79	0.58
Acido palmitico	3.17	3.14	0.02	3.16	3.14	0.01	0.12	0.35
Acido palmitoleico	1.68	1.56	0.09	1.54	1.70	0.09	0.28	0.16
Acido stearico	14.0	14.4	0.40	14.3	14.1	0.41	0.48	0.74

LA BANDA PENTASETTIMANALE: UNA TERAPIA MANAGERIALE

THE 5 WEEKS BATCH FARROWING: A ZOOTECHNICAL THERAPY

MAZZONI C.[1], SCOLLO A.[2]

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

Parole chiave: Banda pentasettimanale, mortalità svezzamenti
Keywords: Five weeks batch farrowing system, weaners mortality

Riassunto
Numerosi agenti patogeni sono responsabili della salute dei suini e possono comportare gravi perdite economiche per l'allevatore. La diffusione all'interno di una popolazione ospite di suini è influenzata dalle possibili interazioni fra gli stessi che vengono raggruppate sotto il concetto di "struttura di contatto" (SC). La ricerca scientifica conferma che i sistemi di gestione tutto pieno/tutto vuoto (AIAO), possono portare a significativi miglioramenti della produttività proprio perché sono in grado di interferire positivamente sulla SC fra i suini. Fra i sistemi zootecnici in grado di meglio realizzare il concetto del rispetto del AIAO, hanno ruolo di rilievo i sistemi in bande plurisettimanali. In questo contesto i suini, di qualsiasi fase produttiva, sono suddivisi in gruppi contraddistinti dallo stesso stadio produttivo e di età simile. Nel presente studio, abbiamo messo a confronto i dati legati alla mortalità dei suinetti negli svezzamenti di un'azienda suinicola a ciclo chiuso, precedenti e successivi alla migrazione da banda bisettimanale a quella pentasettimanale. I motivi della scelta erano stati dettati dal tentativo di sovvertire le drammatiche perdite degli svezzamenti dove, ogni intervento implementato, sembrava risultare vano. Grazie ai grafici di controllo statistico di processo (SPC) è stato possibile dimostrare un miglioramento di questo dato dove le percentuali legate alle perdite dei due gruppi sono passate dal 19.75% per la fase in banda bisettimanale, ad un 7.90% per la fase della banda pentasettimanale.

Abstract
Specific pathogens can be responsible for the health of pigs and can lead to serious economic losses for the farmer. The spread within a host population of pigs is influenced by interactions between them are grouped under the concept of "contact structure" (SC). Scientific research confirms that all-in/all-out (AIAO) systems can lead to significant improvements in productivity because they are able to have positive effects on SC. Among the breeding systems useful to implementing the concept of AIAO, batch farrowing systems have a key role. In this context, pigs of any production stage are grouped and characterized by the same production stage and of similar age. In the present study, we compared the data related to the mortality of weaned piglets of a saw to finish pig farm, before and after the transition from two weeks to five weeks batch farrowing system. We decided for this transition cause to the dramatic losses in weaning where every intervention implemented seemed to be vain. Thanks to the statistical process control (SPC) graphs, it was possible to demonstrate an improvement of this data from 19.75% for the two weeks phase, to 7.90% for the five weeks batch farrowing system.

INTRODUZIONE

Con l'evoluzione della suinicoltura, da semplice attività famigliare ad impresa intensiva, il principale problema che hanno dovuto affrontare gli allevatori, è stato quello della gestione

degli spazi, ovvero dove e come mettere i lotti dei suini prodotti. A questa annosa questione, va aggiunta la recente normativa sul benessere che, nella applicazione della gestione degli spazi, ha una fase decisiva. Tale contesto manageriale, che con il passare degli anni ha assunto la denominazione di management o gestione dei flussi, ha nel punto di origine della produzione, quindi nella scrofaia, un sito di cruciale e decisiva importanza.
Numerosi agenti patogeni possono essere responsabili della salute dei suini e, a seconda degli agenti patogeni considerati, le vie di trasmissione variano e possono comportare gravi perdite economiche per l'allevatore. Le vie di trasmissione maggiormente coinvolte sono quella diretta, attraverso il contatto con animali infetti, o indiretta attraverso persone, sperma, feci, roditori, aerosol, mangimi, acqua o fomiti. Gli animali più giovani sono più suscettibili alle infezioni a causa della progressiva scomparsa dell'immunità materna mentre non hanno ancora sviluppato un'immunità attiva. Gli animali più adulti sono viceversa considerati più resistenti, ma allo stesso tempo possono anche ospitare più agenti infettivi a causa di precedenti infezioni. La diffusione all'interno di una popolazione ospite di suini è influenzata dalle possibili interazioni fra gli stessi che vengono raggruppate sotto il concetto di "struttura di contatto" (SC). La SC corrisponde all'esistenza (ciclo chiuso o ciclo aperto), al tipo (diretto o indiretto), all'intensità ed alla frequenza dei contatti tra gli animali (Klinkenberg et al., 2002; Eble´ et al., 2006).
La ricerca scientifica, avallata dall'esperienza di campo, conferma che i flussi unidirezionali dei suini e i sistemi di gestione tutto pieno/tutto vuoto (AIAO), ove disinfezione e tempo di riempimento dei locali riescono a rispettare tempistiche ottimali, possono portare a significativi miglioramenti della produttività proprio dal momento che sono in grado di interferire positivamente sulla SC fra i suini. Ecco che allora avere un management dei flussi che permetta di trasferire lotti di animali distanziati da più settimane, in ambienti vuoti e adeguatamente puliti, della stessa età, magari di consistenza più numerosa e con lo stesso stato sanitario, rispetto al sistema classico a cadenza settimanale, potrebbe rappresentare un vantaggio (Bown 2006). Trasferendo suinetti ogni settimana, di età diverse e con lotti più piccoli, risulta più difficile l'attuazione di un AIAO efficace soprattutto laddove vi sia una gestione dei ritardatari/scarti non avveduta, già partendo dalla sala parto, ma ancora di più negli svezzamenti e negli ingrassi (Hébert et al., 2007).
Fra i sistemi zootecnici in grado di ben realizzare il concetto del rispetto del AIAO, hanno ruolo di rilievo i sistemi in bande. In questo contesto i suini, di qualsiasi fase produttiva, sono suddivisi in gruppi contraddistinti dallo stesso stadio produttivo (soprattutto per le scrofe) e di età simile (soprattutto per le progenie) (Brown, 2006). Le bande maggiormente utilizzate, sono quelle a due, tre, quattro e cinque settimane (Rix M. and Ketchem R. 2016) dove queste settimane altro non rappresentano che l'intervallo fra una svezzata e quella successiva e indicano, pertanto, il "ritmo della banda".
La scelta della banda più appropriata da adottare dipende da molti fattori, i più importanti da considerare sono: la consistenza numerica delle scrofe presenti e l'eventuale piano di investimenti futuro per la crescita del numero delle scrofe, le capacità numerica dei siti uno, due e tre (ad esempio: numero di gabbie parto, posti nello svezzamento, etc.), alloggi disponibili per sottopopolazioni animali critiche, i periodi di lavoro del personale (la banda porta a picchi di lavoro intervallati a periodi di minore attività), l'età dei suinetti allo svezzamento desiderata, la disponibilità del seme, le distanze di trasporto dei suinetti e la loro consistenza numerica, i tempi di vuoto sanitario in sala parto e le attività manageriali richieste per ottenerli (Daniels 2017; Chouet et al. 2003).
Avere un ritmo di banda lungo (3-4-5 settimane) permette di realizzare intervalli meglio definiti fra i lotti di animali con una conseguente migliore gestione dei vuoti e dei lavaggi permettendo di realizzare un ottimo AIAO degli ambienti (Lurette et al., 2008). Inoltre, è tipico

di questa gestione, avere una certa segregazione per età dei flussi e, quindi, suini provenienti da diverse bande (essendo diversi per età e peso) vengono ospitati in locali diversi riducendo i rischi dell'SC (contatti diretti). Questa è la ragione per cui la banda risulti un sistema fortemente raccomandato per controllare lo stato di salute della mandria (Berends et al., 1996; Dahl et al., 1997; Madec et al., 1998; Rose et al., 2003), inoltre è stato osservato un miglioramento dell'incremento ponderale giornaliero (Schinckel et al., 2002) ed una ottimizzazione della manodopera in tutti i settori dell'allevamento, dai riproduttori fino ai grassi.
L'introduzione di un sistema di gestione in banda porta ad un approccio più strutturato nella gestione degli allevamenti con gruppi più ampi di suinetti, meno movimentazioni e mescolanza di età diverse, traducendosi in un migliore stato sanitario generale della mandria. Fino ad oggi, poco è stato scritto per quanto riguarda i vantaggi sulla sanità di un sistema di gestione in banda plurisettimanali (soprattutto a quattro o cinque settimane) (Vangroenweghe et al., 2012), ma i vantaggi di questo sistema sembrano molto incoraggianti, ciò può essere conseguente all'intervallo più lungo tra i lotti di suini e alla riduzione del numero di bande presenti in allevamento (Chouet et al. 2003). A questo riguardo Mekerke e Leneveu (2006) hanno suggerito che la rigorosa separazione dei gruppi di età in un sistema quadrisettimanale e in un pentasettimanale consente di avere solo un lotto di scrofe nella sala parto, il che potrebbe migliorare le condizioni di salute e, di conseguenza, anche le prestazioni di crescita dei suini nell'allevamento. Per verificare questa ipotesi, Vangroenweghe et al. (2012), hanno studiato i potenziali vantaggi per la salute delle mandrie dei suinetti in sala parto prima e dopo una migrazione da una gestione in banda settimanale verso una a bande a 4 e 5 settimane. Il diverso management sembra posticipare o rallentare la sieroconversione dei suini per alcuni agenti patogeni economicamente importanti, come il virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (PRRS), *Micoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneuminiae* e *Lawsonia intracellularis*. Ciò potrebbe consentire all'allevatore la possibilità di vaccinare i suini prima che entrino in contatto con l'agente patogeno e pertanto di avere più tempo per sviluppare l'immunità prima dell'infezione. Pertanto, il passaggio della gestione di un allevamento, soprattutto a 4 o 5 settimane potrebbe avere effetti protettivi per la salute dei suinetti e, più in generale, per lo stato di salute degli allevamenti, con anche sensibili riduzioni della mortalità. Inoltre, oltre il 60% degli allevamenti che hanno applicato uno di questi due sistemi di banda, ha mostrato un netto miglioramento delle condizioni igieniche, vero beneficio di questa gestione (Vangroenweghe et al. 2012). Sia una migliore salute che migliori condizioni igieniche ci portano a un altro concetto fondamentale, vale a dire una maggiore efficacia della copertura vaccinale e dei trattamenti medicamentosi.
Un altro aspetto legato al miglioramento sanitario è dovuto ad un'introduzione di scrofette e verri per la rimonta, certamente più puntuale. L'obiettivo principale è quello di non alterare l'equilibrio delle malattie all'interno della mandria esistente, cosa che potrebbe accadere introducendo troppe scrofette in una sola volta esponendole così troppo rapidamente alle malattie della mandria, in modo da provocare una recrudescenza delle malattie stesse.
Nel presente lavoro, abbiamo messo a confronto i dati legati alla mortalità negli svezzamenti di un'azienda suinicola a ciclo chiuso, precedenti e successivi alla migrazione da banda bisettimanale a quella pentasettimanale. I motivi della scelta erano stati dettati dal tentativo di sovvertire le drammatiche perdite degli svezzamenti dove, ogni intervento implementato, sembrava risultare vano.

MATERIALI E METODI

Struttura

L'azienda agricola oggetto dello studio, si trova ubicata nella Pianura Padana, e si dedica all'allevamento di suini destinati alla produzione del prosciutto di Parma DOP. Si tratta di un

allevamento convenzionale a ciclo semi-chiuso non in grado di completare sia lo svezzamento che l'ingrasso di tutta la produzione. Quest'ultima, infatti, viene perfezionata in parte in uno svezzamento ed in parte in un ingrasso delocalizzati rispettivamente a 11 e 36 chilometri di distanza da sito principale oggetto dello studio. I dati dei siti esterni non sono stati inclusi nel presente lavoro viste le enormi ed imponderabili variabili connesse. L'azienda aveva una consistenza numerica di circa 800 scrofe di genetica ibrida olandese con rimonta esterna, accasata con frequenza bimestrale in una struttura vicina, ma esterna all'azienda distante circa 100 metri dalla gestazione. Sono inoltre presenti 2500 svezzati, 2000 magroni e 3500 grassi circa. La consistenza del personale è di 7 dipendenti, 4 sulle scrofe e 3 per lo svezzamento-ingrasso. Il giro delle scrofe dallo svezzamento al parto successivo segue un regolare flusso di movimentazione ottemperante delle normative vigenti in tema di benessere e biosicurezza. L'alimentazione del sito è garantita da un mangimificio aziendale in grado di soddisfare tutte le necessità del processo produttivo e, mentre in gestazione l'alimento è fornito con impianto a bagnato, in sala parto tutto è manuale con due pasti giornalieri. Le curve di ingestione sono fornite dalla casa genetica e periodicamente monitorate dai consulenti del fornitore dei nuclei integrati.

Management dell'azienda

Al momento della scelta aziendale di migrare verso la banda pentasettimanale, l'azienda si trovava in una gestione a bande bisettimanali definita internamente "alla belga" per il particolare meccanismo di svezzamento ben presente in questo paese. Infatti, tutti gli eventi zootecnici, quali svezzamento, fecondazioni e parti erano suddivisi all'interno di due settimane, come canonicamente definito da questa banda, ma lo svezzamento veniva slittato in avanti di 3-4 giorni al termine di ogni ciclo di interparto per permettere di allungare il periodo di permanenza dei suinetti sottoscrofa (23 giorni di media) al fine di garantirsi un loro maggior peso allo svezzamento. Si verificava pertanto che, per quattro mesi lo svezzamento avvenisse al giovedì e per i quattro mesi successivi lo svezzamento fosse di lunedì e così via.

Stato sanitario e trattamenti

Lo stato sanitario del sito è definibile di basso profilo: Influenza, PRRSv e Circovirus di tipo 2 (PCV2) positivo, APP Biotipo 1 sierotipo 9 positivo, *Streptococcus suis* sierotipi 2 e 9 positivo, *Haemophilus parasuis* positivo, *Lawsonia intracellularis*, *Brachispira hyodisenteriae* e *Salmonella choleraesuis* positivo, Rotavirus tipo A ed *Eschierichia coli* ETEC (F4 ed F18) positivo. Il piano di vaccinazione sulle scrofe gestanti prevedeva: Influenza, con tre antigeni, *Streptococcus suis* (sierotipi 2 e 9) ed *Haemophilus parasuis* stabulogeno (a 80-90 giorni). Per le scrofette gestanti, oltre al piano previsto per le scrofe si effettuava una vaccinazione contestuale per Rotavirus (Scourguard 3 in deroga dal bovino) e per *E. coli* e Clostridi (a 70-80 giorni). A queste vaccinazioni venivano aggiunte le vaccinazioni periodiche dell'intera mandria per PRRS ogni 3 mesi e per PCV2 ogni 6 mesi. In sala parto il piano vaccinale di scrofe e scrofette prevedeva un richiamo trivalente per Mal rossino, Parvovirus e Leptospira. Tutto il panel delle vaccinazioni sui riproduttori veniva realizzato per via intramuscolare ad eccezione del PCV2 per via intradermica.

Per i suinetti in sala parto la time line dei trattamenti prevedeva: manipolazione entro 3-5 giorni dalla nascita con castrazione, taglio coda e somministrazione per via parenterale di ferro e antibiotico; a 10-14 giorni dalla nascita ulteriore somministrazione di ferro e vaccino PRRSv; infine all'operazione di timbratura delle cosce (come da disciplinare per la DOP del Prosciutto di Parma) veniva effettuata la vaccinazione combinata per Circovirus di tipo 2, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Lawsonia intracellularis* (fra i 18 ed i 20 giorni). In sede di accrescimento venivano effettuate una vaccinazione con tossoide per APP e micoplasma,

attorno all'ottava settimana post svezzamento con richiamo tre settimane dopo del solo APP. Nel febbraio del 2022 è stata confermata la diagnosi di PCV2 in magronaggio e pertanto è stata introdotta una seconda vaccinazione con PCV2 attorno alla settima settimana post svezzamento associandola con il micoplasma e slittando all'inizio della nona settimana il piano di vaccinazione dell'APP. Diversi tentativi sono anche stati condotti abbinando la vaccinazione della PRRSv e dello *Streptococcus suis* nella prima settimana post svezzamento.

Processo di migrazione in banda pentasettimanale

La migrazione da banda bisettimanale a pentasettimanale sulle scrofe è avvenuta a partire dal 21 novembre 2022 (giorno di inseminazione della prima banda), ed è stata resa possibile sia attraverso l'uso del management (ritardato svezzamento delle scrofe, salto calore allo svezzamento) che attraverso il fondamentale impiego di presidi ormonali (progestinico, gonadotropine e prostaglandine). L'uso degli ormoni per controllare il ciclo estrale, ed in particolare quelli in grado di sincronizzare gli estri, rendono infatti il passaggio più semplice da realizzare (Corezzolla et al., 2020).

Per effettuare una migrazione da un sistema a bande all'altro è stato necessario aver pianificato tutti gli eventi dell'azienda. Il punto di partenza è stato pertanto l'analisi del pig flow (flusso dei suini), ritenuto il punto chiave della gestione di qualsiasi azienda di suini e di scrofe in particolare. Nelle fasi di transizione da un sistema di banda ad un altro, è necessario gestire un altro strumento, chiamato convenzionalmente "rullo" a causa delle sue caratteristiche. Si tratta infatti di una striscia di carta che viene facilmente arrotolata su di sé (da cui rullo) e sulla quale è possibile rappresentare e pianificare gli eventi aziendali. Con questo strumento, partendo dai dati del pig flow, è stato possibile costruire con una certa precisione le varie bande. Inoltre, è possibile calendarizzare tutti gli interventi ormonali, nonché gli eventi manageriali, necessari per la migrazione da una banda all'altra. La compilazione del rullo richiede competenze superiori rispetto a quelle del pig flow ed inoltre, l'esperienza ha insegnato che per la transizione verso nuove bande, i calcoli non possono essere fatti per tutte le bande nella fase iniziale della pianificazione, ma massimo due bande per volta. Il processo di migrazione si è concluso l'8 marzo 2023 con la inseminazione della quarta ed ultima banda.

Raccolta dati

Dal 13 gennaio del 2022, sono stati raccolti i dati della mortalità nello svezzamento, scarti esclusi, di ciascuna banda bisettimanale svezzata. A partire dal 10 di aprile, sono state inserite, con lo stesso criterio, le bande svezzate in pentasettimanale (Tabella 1). Talune date di svezzamento della banda bisettimanale non sono consequenziali poiché fanno riferimento a quei lotti di svezzamento che venivano inviati al sito due esterno, non incluso nello studio. Così come alcune svezzate in pentasettimanale, presentano un ridotto numero di svezzati rispetto alle altre visto che una parte della svezzata, veniva dirottata verso lo stesso sito due esterno di cui sopra. La data del 10 aprile 2023 corrisponde alla data di svezzamento della prima banda pentasettimanale e vale la pena ricordare, che la data del 21 novembre 2022 coincide con la inseminazione della prima banda pentasettimanale.

Analisi statistica

Con il fine di fornire informazioni utili sull'esistenza di differenze sulle mortalità prima e dopo del passaggio in banda pentasettimanale, sono stati applicati i grafici di controllo statistico di processo (SPC) suggeriti da Scollo et al. (2022), in un'ottica di zootecnica di precisione (Precision Livestock Farming PLF) (Garcia R. et al., 2020).

Creazione dei Grafici

Observation in SPC	DATA SVEZZAMENTO	ENTRATI	DATA USCITA	N. MORTI	N.USCITI	Mortalità In Svezzamento
Obs 1	13/06/2022	802	01/08/2022	106	696	13,22%
Obs 2	27/06/2022	728	15/08/2022	39	689	5,36%
Obs 3	11/07/2022	590	29/08/2022	88	502	14,92%
Obs 4	11/08/2022	664	29/09/2022	178	486	26,81%
Obs 5	25/08/2022	752	13/10/2022	196	556	26,06%
Obs 6	08/09/2022	688	27/10/2022	128	560	18,60%
Obs 7	06/10/2022	609	24/11/2022	160	449	26,27%
Obs 8	20/10/2022	663	08/12/2022	110	553	16,59%
Obs 9	03/11/2022	590	20/01/2023	178	412	30,17%
Obs 10	17/11/2022	580	11/01/2023	113	467	19,48%
Obs 11	19/12/2022	530	06/02/2023	105	425	19,81%
Obs 12	02/01/2023	645	23/02/2023	25	620	3,88%
Obs 13	16/01/2023	620	09/03/2023	8	612	1,29%
Obs 14	27/01/2023	620	24/03/2023	16	604	2,58%
Obs 15	02/03/2023	740	26/04/2023	97	643	13,11%
	Totale	**9821**		**1547**	**8274**	**15,75%**
Obs 16	10/04/2023	1455	06/06/2023	98	1357	6,7%
Obs 17	15/05/2023	1176	14/07/2023	87	1089	7,4%
Obs 18	19/06/2023	1611	18/08/2023	112	1499	7,0%
Obs 19	24/07/2023	435	19/09/2023	79	356	18,2%
Obs 20	04/09/2023	1496	31/10/2023	100	1396	6,7%
Obs 21	09/10/2023	1007	01/12/2023	108	899	10,7%
Obs 22	13/11/2023	1097	19/01/2023	107	990	9,8%
	Totale	**8277**		**691**	**7586**	**8,3%**

Tabella 1: Andamento delle mortalità nello svezzamento prima e dopo il passaggio in banda pentasettimanale. *Obs. Indicano il susseguirsi delle osservazioni dell'analisi statistica.*

Table 1*: Mortality trend in weaning before and after the transition to the five-week batch farrowing system. Obs. indicate the succession of observations of the statistical analysis.*

I dati sulla mortalità per ogni lotto sono stati inseriti in un foglio Excel. I grafici SPS sono stati creati utilizzando il programma XLTAT. La mortalità, indicatore di performance del processo, è stata calcolata come la proporzione (espressa come percentuale) di suinetti morti in ogni lotto specifico. Seguendo il consiglio di Wheeler and Poling's sono stati utilizzati grafici individuali (individual charts).

Il grafico individuale mostra misurazioni del singolo lotto. La linea centrale (Center Line, CL) rappresenta la media dei valori utilizzati per il calcolo dei limiti di controllo. I limiti superiori di allerta (Upper Control Limits, UCL) e i limiti inferiori (Lower Control Limits, LCL) sono stati calcolati utilizzando tre deviazioni standard. Altri due limiti intermedi sono stati creati utilizzando una (linea C) e due (linea B) deviazioni standard. Il superamento di UCL e LCL indica che il processo sta cambiando e necessita di attenzione (segnali di allerta): il processo è stato considerato drasticamente fuori controllo.

Il software etichetta i punti rilevanti con il numero del test che segnala l'evidenza di una variazione per causa speciale. La mortalità media (%) durante ciascuno dei periodi è stata calcolata attraverso un'analisi descrittiva.
Sono stati eseguiti tutti gli otto test per cause speciali di variabilità disponibili nel software statistico ed elencati qui di seguito:

Test 1: 1 punto oltre 3 deviazioni standard (fuori dal segnale di controllo)
Test 2: 9 punti successivi sullo stesso lato (segnale di allerta)
Test 3: 6 punti successivi in crescita o in calo (segnale di allerta)
Test 4: 14 punti successivi con alternanza up e down
Test 5: 2 su 3 punti successivi oltre 2 deviazioni standard (stesso lato, segnale di allerta)
Test 6: 4 su 5 punti successivi oltre 1 deviazione standard (stesso lato, segnale di allerta)
Test 7: 15 punti successivi all'interno di 1 deviazione standard (entrambi i lati, segnale di allerta)
Test 8: 8 punti successivi non all'interno di 1 deviazione standard (entrambi i lati, segnale di allerta)

RISULTATI

I dati relativi alla mortalità nel sito di svezzamento oggetto dello studio sono stati raccolti per 22 bande di svezzamento, 15 relative alla banda bisettimanale e 7 relative alla banda pentasettimanale. La media della mortalità negli svezzamenti era del 15,75% in banda bisettimanale passando poi all'8,30% una volta migrati a banda pentasettimanale.

La **Figura 1** mostra il grafico SPC dove le 22 osservazioni ottenute sono state utilizzate per impostare la linea centrale di processo (CL) e i limiti di controllo superiore (UCL) ed inferiore (LCL) al superamento dei quali il processo è stato considerato drasticamente fuori controllo come nel caso del test 1 (obs 9). Il test 2 dà un segnale di allerta, dal momento che lo scostamento dal CL è costante con ben il 44,4% delle osservazioni (4/9) oltre le due deviazioni standard. Il test 3 conferma un allarme, ma verso la direzione opposta rispetto al CL, indicando una variazione. Il test 5 mette in evidenza due osservazioni consecutive nello stesso lato del grafico, con oltre due deviazioni standard (obs 13 e 14) così come il test 6 evidenzia 4 osservazioni oltre una deviazione standard su 5 consecutive (obs da 12 a 16), confermando un allarme indice di una forte inversione di tendenza rispetto al precedente andamento sulla CL. Vale la pena sottolineare che la vera differenza fra i due processi, sia evidenziabile già a partire dall'obs 12. La frequenza dei segnali fuori controllo nella prima parte del grafico (obs 1 fino ad obs 11), sono stati pari ad 1 (9%) mentre nella seconda parte, a partire dall'obs 12 fino alla 22 sono stati dello 0%. I dettagli in merito ai segnali di avviso di variazione per causa speciale e punti fuori controllo nel processo sono riportati da Scollo et al. (2022).

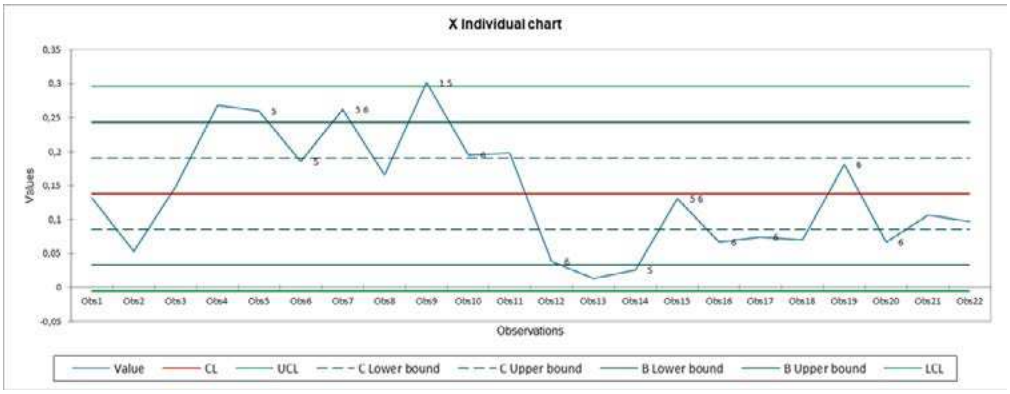


Figura 1: Grafico X individual chart per la mortalità nello svezzamento prima e dopo il passaggio da banda bisettimanale a banda pentasettimanale. Linea centrale di processo (LC, linea rossa), limiti di allerta superiore ed inferiore (UCL ed LCL, linee verdi chiare) calcolati per tre deviazioni standard. Altri due limiti intermedi sono stati creati utilizzando una (linea C verde tratteggiata CLb e CUb) e due (linea B verde scura BLb e BUb) deviazioni standard.

***Figure 1**: X individual chart for weaning mortality before and after the transition from the bi-weekly band to the five-week band. Process center line (LC, red line), upper and lower alert limits (UCL and LCL, light green lines) calculated for three standard deviations. Two more intermediate boundaries were created using one (dashed green C line CLb and CUb) and two (dark green B line BLb and BUb) standard deviations.*

DISCUSSIONE

La situazione sanitaria piuttosto precaria degli svezzamenti aveva gettato in un profondo stato di sconforto tutto il gruppo di lavoro, proprietà in primis. Inoltre, nonostante numerosi interventi sui piani vaccinali, piuttosto che sui trattamenti medicamentosi, niente sembrava sortire effetti promettenti. Pertanto, si è deciso di affrontare un processo radicale e di grande impatto sulla gestione dei flussi come il passaggio alla banda pentasettimanale.

I dati relativi alla mortalità nel sito di svezzamento oggetto dello studio sono stati raccolti per 22 bande di svezzamento (Tabella 1), 15 relative alla banda bisettimanale e 7 relative alla banda pentasettimanale. La media della mortalità negli svezzamenti era del 15,75% in banda bisettimanale passando poi all'8,30% una volta migrati a banda pentasettimanale. I risultati dell'analisi SPC mettono in evidenza una differenza significativa legata al passaggio da un sistema all'altro di banda, confermando che la migrazione a banda pentasettimanale ha apportato un decisivo miglioramento sulla mortalità dei suinetti in svezzamento. I dati del grafico evidenziano però che il miglioramento sulla mortalità dello svezzamento, è già significativamente apprezzabile dall'obs. 12 ovvero dalla svezzata del 02 gennaio 2023 e non come ci attendavamo dalla svezzata del 10 aprile 2023 (obs. 16). In effetti, accorpando le perdite delle svezzate legate alle obs. 12, 13, 14 e 15, ancora in banda bisettimanale a quelle successive della banda pentasettimanale vera e propria, le percentuali legate alle perdite dei due gruppi cambierebbero enormemente passando dal 15.75% ad un 19.75% per il gruppo della banda bisettimanale, e da un 8.30% ad un 7.90% per il gruppo della banda pentasettimanale ampliando ulteriormente la forbice. Il motivo di tale risultato potrebbe essere imputabile alla drastica riduzione della movimentazione delle scrofe gestanti avvenuta sin dalle prime settimane già precedenti al 21 novembre 2022 (data dell'inseminazione della prima banda pentasettimanale). Vale la pena ricordare infatti che, con il fine di costituire le bande più grosse, a partire dalla svezzata del 03 novembre, le scrofe venivano tenute sotto trattamento progestinico, per sincronizzarne l'estro con la svezzata del 17 novembre 2022 (da cui l'inseminazione il 21 novembre) cosa che ne ha impedito l'usuale spostamento verso i box gestazione nei tempi previsti dalla banda bisettimanale. Questa ipotesi confermerebbe quanto sostenuto da Mekerke e Leneveu (2006) dove, la rigorosa separazione dei gruppi in un sistema quadrisettimanale e pentasettimanale, consente di avere solo un lotto di scrofe in sala parto, migliorando così le condizioni di salute e dell'allevamento. Inoltre, con il progressivo svuotamento dei box gestazione verso le sale parto, e un loro più lento tempo di riempimento, tipico della banda pentasettimanale, la fase di AIAO veniva meglio rispettata, permettendo una migliore igienizzazione degli spazi, perfettamente in linea con quanto evidenziato da Vangroenweghe et al. (2012). Certamente, l'assenza di un tempo adeguato a effettuare il vuoto sanitario, dovuto ad una veloce rotazione delle sale parto, era il limite maggiore imposto dai tempi della precedente banda bisettimanale.

CONCLUSIONI

Tutti ormai conoscono buona parte dei meccanismi che regolano i sistemi in banda, ma non tutti colgono l'essenza dei vantaggi sanitari che apportano. L'aspetto che sembra contare molto è che il numero dei trasferimenti degli animali, dalle scrofe ai suinetti, si riduce drasticamente interferendo così, in modo importante, con la gestione dei flussi e quindi con la "struttura di

contatto". Inoltre, ogni attività zootecnica viene dilatata nel tempo, ad esempio ogni 2, 3, 4, 5 o 7 settimane in concomitanza con gli intervalli settimanali tipici di ciascun sistema di banda. Già partendo dalle scrofe, possiamo contare su lotti più numerosi e più o meno aventi tutti gli stessi giorni di gestazione. È possibile anche rendersi conto di un effetto banda, ovvero di eventi che con ciclicità si ripetono all'interno dello stesso gruppo di animali, anche al ciclo successivo, quasi come renderli un piccolo allevamento all'interno dell'allevamento stesso. Davvero importanti sono poi i vantaggi ottenuti all'interno della sala parto e, due su tutti meritano attenzione: il primo è l'omogeneità dell'età dei suinetti (tutti fratelli), ed il secondo punto è relativo a una diversa gestione del tempo, che permette di lavorare con un maggior livello di biosicurezza interna. Questo concetto legato al tempo risulta davvero fondamentale anche per gli svezzamenti. Con il susseguirsi settimanale delle svezzate, i virus (soprattutto la PRRSv) ed i batteri mantengono una certa virulenza, proprio perché possono passare da un lotto di suinetti svezzato all'altro nel pieno della loro fase di replicazione (fase iniziale dell'infezione). Dal momento in cui passassero più settimane fra uno svezzamento e l'altro, i microrganismi incontrerebbero il lotto dei suinetti della svezzata successiva in una fase diversa della loro curva di infezione avendo effetti verosimilmente diversi.

Alcune obiezioni sulle bande potrebbero arrivare in merito alla possibile riduzione della produzione che queste conversioni, partendo da una banda settimanale, potrebbero apportare. Tuttavia, sebbene questo sia vero solo per la banda trisettimanale, il punto dovrebbe essere un altro. Il passaggio in bande plurisettimanali, infatti, non deve essere visto come un sistema definitivo in cui convertire l'azienda, ma come uno strumento terapeutico né più e né meno di una medicina, proprio laddove la medicina fino ad oggi sembra avere ottenuto pochi risultati. Questo concetto fa sì che una volta guariti dalla malattia, si potrebbe ritornare ai precedenti sistemi di lavoro.

I vari microrganismi, ed il virus della PRRS in modo particolare, hanno trovato nel management delle nostre aziende, il sistema per rimanere endemici. Ecco perché dobbiamo agire direttamente sul loro terreno, ragionando come loro, quindi a livello manageriale. Viene da sé che le bande, oltre che la biosicurezza, siano due strumenti estremamente interessanti per il controllo della sanità, proprio per le forti implicazioni manageriali che hanno.

BIBLIOGRAFIA

1. Berends BR, Urlings HAP, Snijders JMA and VanKnapen F (1996). Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding Salmonella spp. in pigs. International Journal of Food Microbiology 30, 37–53.
2. Bown P (2006). Advantages and disadvantages of batch farrowing. Farm Animal Practice 28, 94–96
3. Chouet S, Pietro C, Mieli L, Veenhuizen MF, McOrist S (2003) Some patterns of exposure to Lawsonia intracellularis infection on European pig farms. Veterinary Record 152, 14–17.
4. Corezzolla, J. L., Ulguim, R. D. R., Gasperin, B. G., Rauber, L. P., & Bianchi, I. (2020). Altrenogest treatment effects on the reproductive performance of sows during transition to batch farrowing. *Ciência Rural*, *50*(9), e20190806. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190806
5. Dahl J, Wingstrand A, Nielsen B, Baggesen DL (1997). Elimination of Salmonella typhimurium infection by the strategic movement of pigs. The Veterinary Record 26, 679–681
6. Daniels CS (2017) Consideration for batch production. 48th Annual Meeting of AASV. Feb 25-28, 2017, 368-369
7. Eble´ P, De Koeijer A, Bouma A, Stegeman A and Dekker A (2006). Quantification of within- and between-pen transmission of Foot-and-Mouth disease virus in pigs. Veterinary Research 37, 647–654.

8. Garcia R, Aguilar J, Toro M, Pinto A, Rodriguez P. (2020) A systematic literature review on the use of machine learning in precision livestock farming. Comput Electron Agric. 179:105826. doi: 10.1016/j.compag.2020.105826
9. Hébert H, Lurette A, Fourichon C, Seegers H, Belloc C (2007). Batch farrowing implementation in pig herds and influence on contact among animals. Comptes Rendus des Journe´ es de la Recherche Porcine 39, 345–350
10. Klinkenberg D, De Bree J, Laevens H and De Jong MCM (2002). Within- and between-pen transmission of classical swine fever virus: a new method to estimate the reproduction ratio from transmission experiments. Epidemiology and Infection 128, 293–299
11. Lurette A, Belloc C, Touzeau S, Hoch T, Seegers H, Furichon C (2008). Modelling batch farrowing management within a farrow-to-finish pig herd: influence of management on contact structure and pig delivery to the slaughterhouse. Anim. 2:1, 105-116.
12. Madec F, Bridoux N, Bounaix S, Jestin A (1998). Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. Preventive Veterinary Medicine 35, 53–72.
13. Mekerke, B., Leneveu, P. (2006). Modifications de conduite de bandes et impact sur la situation sanitaire: analyse de quelques examples. Proc. Association Française de Medecine Veterinaire Porcine, Toulouse, France, pp. 49–64
14. Rix M Ketchen R. (2016) Batch farrowing interest grows with demand for larger groups of weanewd pogs. National Hog Farmer, Oct 10, 2016, Available at: https://www.nationalhogfarmer.com/farrowing/batch-farrowing-interest-grows-with-demand-for-larger-groups-of-weaned-pigs accessed: 08 febbraio 2024
15. Rose N, Larour G, Le Diguerher G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F (2003). Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. Preventive Veterinary Medicine 61, 209–225
16. Schinckel A, Smith JW, Tokach MD, Dritz SS, Einstein M, Nelssen JL, Goodband RD (2002). Two on-farm data collection methods to determine dynamics of swine compositional growth and estimates of dietary lysine requirements. Journal of Animal Science 80, 1419–1432
17. Scollo A., Fasso M., Nebbia P., Mazzoni C., Cossettini C. (2022) Managing Shiga Toxin-Producing E. coli Using Statistical Process Control Charts for Routine Health and Production Monitoring in Pig Farming; Frontiers in Veterinary Science; March 2022; Vol. 9; Art. 814862
18. Vangroenweghe, F., Suls, L., Van Driessche, E., Maes, D., & De Graef, E. (2012). Health advantages of transition to batch management system in farrow-to-finish pig herds. Veterinari Medicina, 57, 2012 (2), 83-91

I FEROMONI: DALLA BIOLOGIA ALLE APPLICAZIONI PER GARANTIRE IL BENESSERE E LA PRODUTTIVITÀ DEL SUINO DOMESTICO

PHEROMONES: FROM BIOLOGY TO APPLICATIONS TO ENSURE THE WELFARE AND THE PRODUCTIVITY OF DOMESTIC PIGS

REATI E.[1], CANELLI E.[2]

BCALM s.r.l.[1]; Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Parma[2]

Parole chiave: Feromoni, Suini, Benessere Animale
Keywords: Pheromones, Pigs, Animal Welfare

Riassunto
In questo studio è stato valutato se e come l'applicazione di un sintetico del feromone materno suino (PAP) avesse l'effetto nel diminuire i comportamenti sociali negativi, le lesioni cutanee e le zoppie delle scrofe al rimescolamento e i comportamenti negativi, la mortalità e la morsicatura della coda dei suinetti nel post svezzamento. In un allevamento a ciclo aperto sono stati selezionati due gruppi (trattato e controllo) sia nel sito 1 (scrofe) che nel sito 2 (svezzamento). Il PAP in forma spray è stato applicato 5 ore prima del rimescolamento delle scrofe, mentre il PAP in diffusori è stato posizionato nella gestazione 24 ore prima dell'ingresso delle scrofe gestanti. Nel gruppo trattato dei suinetti il PAP in forma di diffusore è stato posizionato 24 ore prima dell'ingresso degli animali. L'utilizzo del PAP nel gruppo scrofe trattato ha portato a una diminuzione dei comportamenti negativi al giorno 1 ($P<0,05$), delle zoppie e delle lesioni cutanee ai giorni 3 e 5 ($P<0,05$). Nei suinetti l'utilizzo del PAP ha indotto una riduzione dei comportamenti negativi nelle prime 24 ore post svezzamento ($P<0,05$) e di morsicatura della coda ai giorni 21 e 28 ($P<0,05$). Non c'è stato effetto sulla mortalità. In conclusione, l'utilizzo dei PAP può essere un valido strumento per ridurre i comportamenti negativi, l'aggressività e il cannibalismo al rimescolamento delle scrofe e nel post svezzamento.

Abstract
In this study, it was evaluated whether and how the application of a synthetic maternal porcine pheromone (PAP) had the effect in decreasing negative social behaviors, skin lesions and lameness of sows at shuffling and negative behaviors, mortality and tail biting of piglets in the post-weaning period. In an open-cycle farm, two groups (treated and control) were selected at both site 1 (sows) and site 2 (weaning). PAP in spray form was applied 5 hours before sow mixing, while PAP in diffusers was placed in gestation 24 hours before the entry of pregnant sows. In the treated piglet group, the PAP in the form of a diffuser was placed 24 hours before the animals entered. The use of PAP in the treated sow group led to a decrease in negative behaviors at day 1 ($P<0.05$), lameness and skin lesions at days 3 and 5 ($P<0.05$). In piglets, the use of PAP induced a reduction in negative behaviors in the first 24 hours after weaning ($P<0.05$) and tail biting at days 21 and 28 ($P<0.05$). There was no effect on mortality. In conclusion, the use of PAPs can be a valuable tool to reduce negative behaviors, aggression and cannibalism at sow shuffling and post-weaning.

INTRODUZIONE

Il benessere nell'allevamento suino è uno degli obbiettivi principali della legislazione attuale e quindi della gestione moderna. Le recenti normative sul divieto del taglio della coda e sulla gestione della scrofa gestante in gruppo hanno imposto modifiche sostanziali all'allevamento intensivo suino.

La morsicatura della coda è oggi percepita come uno dei problemi principali, in particolare nelle fasi di svezzamento e magronaggio, con conseguenze gravi sulla mortalità e sulla qualità della carcassa [1]. Ugualmente l'aggressività tra scrofe al rimescolamento rappresenta un grave rischio non solo per la sopravvivenza degli animali, ma anche per il mantenimento della gravidanza [2].

I suini hanno un sistema olfattivo altamente sviluppato [3] e l'importanza dei feromoni per il raggiungimento della pubertà [4], e la ricettività dell'accoppiamento [5] sono ben noti. Anche durante l'allattamento i feromoni svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attaccamento del neonato alla madre [6]. Tutti i mammiferi in lattazione secernono dalla cute del capezzolo particolari feromoni che calmano e trasmettono sicurezza ai piccoli [6]. Tali feromoni sono stati chiamati feromoni di appagamento o apaisine [6]. Le apaisine presentano la stessa struttura chimica: tre acidi grassi sempre nello stesso ordine (acido oleico, acido palmitico e acido linolenico) [6]. I feromoni appaganti materni (AP appeasing pheromones) si sono dimostrati molto efficaci in altre specie, come quella canina, per la gestione dello stress e come strumenti per migliorare il benessere animale [7]. Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di valutare come l'utilizzo di analoghi dei feromoni appaganti materni suini (PAP) possa migliorare il benessere nei due momenti più critici (svezzamento e rimescolamento delle scrofe) in un allevamento intensivo a ciclo aperto convenzionale.

MATERIALI E METODI

I dati sono stati raccolti presso una scrofaia di 735 scrofe in provincia di Brescia; per la raccolta dei dati non sono state utilizzate procedure invasive per gli animali.

Analogo sintetico del feromone appagante materno. I diffusori (Securepig® IRSEA, Quartier Salignan France) sono costituiti da gelatina composta da acqua (>90%), tensioattivo non ionico (4%) a gomma gel (3%) e principio attivo PAP (2%). I componenti attivi del blocco PAP sono: metile caprilato, metile laurato, metile miristato, metile palmitato, metile linoleato, metile oleato. Il peso totale dei diffusori è 150g. Lo spray (Securepig® FLASH IRSEA, Quartier Salignan France) è costituito da una soluzione acquosa (>90%) e principio attivoPAP (2%). Il peso totale è 1kg.

Le scrofe: gruppo trattato. Sono state svezzate dai propri suinetti 28 scrofe di diversi ordini di parto (0-6) (ibridio commerciale Topigs x Goland) e sono state stabulate in gabbia singola. Dopo 5 giorni dallo svezzamento le scrofe hanno ricevuto 2 inseminazioni a distanza di 24 ore l'una dall'altra. Il giorno dopo la seconda inseminazione le scrofe sono state spostate nel gruppo gestazione ed è iniziata la fase sperimentale. La razione delle scrofe è stata distribuita tramite autoalimentatori 2 volte al giorno e l'accesso all'acqua era ad libitum attraverso 35 abbeveratoi.

Le scrofe: gruppo controllo. La settimana successiva sono state svezzate altre 43 scrofe anche esse stabulate in gabbia singola. Dopo 5 giorni dallo svezzamento le scrofe hanno ricevuto 2 inseminazioni a distanza di 24 ore l'una dall'altra. Il giorno dopo la seconda inseminazione le scrofe sono state spostate nel gruppo gestazione ed è iniziata la fase sperimentale. La razione delle scrofe è stata distribuita tramite autoalimentatori 2 volte al giorno e l'accesso all'acqua era ad libitum attraverso 35 abbeveratoi.

Stabulazione e trattamento. L'esperimento è stato svolto all'interno di una gestazione dinamica, in un gruppo di circa 400 scrofe, di forma rettangolare con una superficie di 540 m^2. Ventiquattro ore prima dell'ingresso in gestazione del gruppo trattato sono stati istallati i diffusori contenenti sintetici dei feromoni appaganti materni suini (Securepig® IRSEA, Quartier Salignan France). I diffusori sono stati appesi a 1,5 m da terra, 1 ogni 25 m^2, lontano dalla ventilazione per garantire la permanenza del trattamento all'interno della stanza. Inoltre ogni scrofa del gruppo trattato, 6 ore prima dell'ingresso in gestazione è stata trattata con 5ml di soluzione al 2% di sintetici dei feromoni appaganti materni suini (Securepig® FLASH IRSEA, Quartier Salignan France) applicata tra le scapole.

Disegno sperimentale. Per la valutazione del benessere sono stati osservati e misurati:
- lesioni cutanee;
- zoppie;
- comportamento;

Secondo le indicazioni dell'Animal Welfare Protocol. Tutte le osservazioni sono state fatte in cieco.
Le scrofe sono state identificate e segnate con numeri da 1 a 28 sulla schiena utilizzando del gesso di color blu per il gruppo trattato e con numeri da 1 a 43 con gesso di colore rosso per il gruppo controllo. Il giorno -1 le scrofe sono state valutate in base al livello di lesioni cutanee e zoppie. Il giorno 0 le scrofe sono state rimescolate nel gruppo gestazione. Il comportamento è stato valutato tramite osservazione diretta degli animali per 15 minuti il giorno 0, 1, 3 e 5 post rimescolamento. Nei giorni 0, 1, 3 e 5 sono stati valutati anche lesioni cutanee e zoppie. Al giorno 5 i diffusori sono stati rimossi dal gruppo gestazione, le finestre sono state aperte ed è stata aumentata la ventilazione per garantire la totale rimozione del trattamento. Al giorno 7 sono stati inseriti nello stesso ambiente gli animali del gruppo controllo i quali sono stati valutati allo stesso modo del gruppo trattato.

Valutazione del comportamento. Il comportamento è stato valutato attraverso l'osservazione diretta degli animali per 15 minuti i giorni 0, 1, 3 e 5. I comportamenti sono stati classificati in: comportamenti positivi (esplorazione dell'ambiente, annusare, interazione sociale), comportamenti negativi (mordere, aggredire e spingere con forza) e comportamenti neutri (bere, mangiare, dormire, defecare e urinare).

Lesioni cutanee. Sono state valutate le lesioni cutanee per ogni singola scrofa nei giorni 0, 1, 3 e 5. Per le lesioni è stato considerato solo un lato dell'animale diviso in 5 aree: orecchie, spalle e testa, da dietro le spalle alle anche, le cosce e gli arti. Ogni area è stata classificata in: A) nessuna lesione o al massimo 4 lesioni, B) da 5 a 10 lesioni e C) da 11 a 15 lesioni. Infine a ogni scrofa è stato dato un punteggio: 0) se tutte le aree del corpo avevano ricevuto classificazione A; 1) se alcune aree del corpo avevano ricevuto classificazione B o al massimo una regione con classificazione C; 2) se 2 o più aree del corpo avevano ricevuto classificazione C o se un'area presentava più di 15 lesioni. Le lesioni sono state standardizzate nel seguente modo:
- un graffio più lungo di 2cm è stato considerato 1 lesione, due graffi paralleli con 0,5cm di distanza l'uno dall'altro sono stati considerati come 1 lesione;
- una ferita inferiore ai 2 cm è stata considerata come 1 lesione;
- una ferita sanguinante lunga dai 2cm ai 5cm o una ferita in stato di guarigione più lunga di 5 cm sono state considerate come 5 lesioni;
- una ferita profonda e aperta più lunga di 5cm è stata considerata come 16 lesioni.

Zoppie. Le zoppie sono state valutate per ogni scrofa nei giorni 0, 1, 3 e 5. Sono state classificate, dopo aver percorso camminando almeno 20 m, in:

0) assenza di zoppia o movimenti lievemente compromessi;
1) presenza di zoppia, con appoggio del peso sull'arto leso
2) zoppia grave con incapacità di distribuire il peso sull'arto leso o animale incapace di alzarsi.

I suinetti. I suinetti sono stati svezzati a circa 28 giorni di età e divisi in box da circa 20 posti ciascuno. Sono stati svezzati suinetti provenienti da 60 scrofe, seguendo l'ordinario management aziendale. Ogni box ha dimensioni di 15 m^2. Ogni box è separato da ringhiere in metallo, il pavimento è in plastica fessurato con fessure di 14 mm. La temperatura era controllata e mantenuta a circa 28.5 °C la prima settimana di svezzamento e poi diminuita gradualmente in relazione al peso e all'età dei suinetti. In ogni box l'acqua è distribuita tramite succhiotti singoli (2 per box, con vaschetta-raccoglitore di acqua sotto ogni succhiotto) e l'alimento distribuito ad libitum in appositi alimentatori.

Stabulazione e trattamento. Per questo esperimento sono state utilizzate 2 stanze identiche per lo svezzamento. Ogni stanza comprendeva 16 box di 15 m^2 dove i suinetti sono stati stabulati per le 5 settimane di svezzamento. Una stanza è stata adibita al trattamento e l'altra al gruppo controllo. Nella stanza adibita al trattamento, 24 ore prima dell'ingresso degli animali sono stati applicati 10 diffusori contenenti sintetici dei feromoni appaganti materni suini (Securepig® IRSEA, Quartier Salignan France). I diffusori sono stati appesi a 1,5m da terra 1 ogni 25 m^2 lontano dalla ventilazione per garantire la permanenza del trattamento all'interno della stanza.

Disegno sperimentale. I suinetti sono stati valutati al giorno 0, 7, 14, 21 e 28 per quanto riguarda il comportamento sociale, la morsicatura della coda e la mortalità secondo le indicazioni del Animal Welfare Protocol. Tutte le valutazioni sono state eseguite in cieco.

Valutazione del comportamento. Il comportamento è stato valutato tramite osservazione diretta degli animali per 15 minuti, lontano dai pasti, al momento dell'ingresso nel sito di svezzamento, dopo 6 ore e dopo 24 ore. I comportamenti sono stati classificati in: comportamenti positivi (esplorazione dell'ambiente, annusare, interazione sociale), comportamenti negativi (mordere, aggredire e spingere con forza) e comportamenti neutri (bere, mangiare, dormire, defecare e urinare).

Morsicatura della coda. La morsicatura della coda è stata valutata nei giorni 0, 7, 14, 21, 28 dall'ingresso dei suinetti nel sito di svezzamento. Gli animali sono stati classificati in:
0) nessuna evidenza di morsicatura della coda o presenza di morsi superficiali sulla lunghezza della coda in assenza di sanguinamento;
2) sangue fresco visibile sulla coda, presenza di rigonfiamenti e infezioni, perdita di parte del tessuto e formazione di crosta.

Mortalità. La mortalità è stata valutata al giorno 28. Sono stati presi in considerazione il numero di animali inseriti in ogni box al momento dello svezzamento e il numero di animali trovati morti (gli abbattimenti non sono stati presi in considerazione) nell'arco dei primi 28 giorni di svezzamento. Per calcolare la percentuale di animali morti è stata applicata la seguente formula: (n° animali morti per box / n° animali per box)*100.

Analisi statistica. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software graphPad prism versione 6.01 for windows, GraphPad software, la Jolla California USA, www.graphpad.com. Per ciascuno giorno di osservazione, per il confronto tra il gruppo dei trattati ed il gruppo di controllo, relativamente alla valutazione delle zoppie e delle lesioni è stato utilizzato il test di Man Whitney; mentre per la valutazione delle attività comportamentali di scrofe e suinetti, della mortalità dei suinetti e della morsicatura della coda dei suinetti, è stato utilizzato un Fisher's exact test.
Per entrambi il valore di significatività di P è stato fissato a 0,05. Nei casi in cui una delle colonne dei comportamenti includesse solo valori 0, quel comportamento è stato eliminato dall'analisi.

RISULTATI

Dati comportamentali scrofe. Ai giorni 0, 1, 3 e 5 del trattamento sono stati valutati i comportamenti negativi e positivi delle scrofe dei due gruppi. I comportamenti negativi nel gruppo controllo a sono risultati significativamente (P<0,05) maggiori rispetto a quelli del gruppo trattato al giorno 1 di trattamento, mentre non è risultata una differenza significativa per quanto riguarda i giorni 3 e 5 di trattamento. (Tabella 1)

	Gruppo trattato				**Gruppo controllo**				**P-value**
	Comportamenti negativi		Comportamenti positivi		Comportamenti negativi		Comportamenti positivi		
Giorno 0	0	0%	0	0%	3	7,14%	0	0%	0,2732
Giorno 1	0	0%	3	11,1%	7	16,6%	0	0%	0,0099
Giorno 3	1	3,7%	5	18,5%	3	7,14%	5	11,9%	0,4122
Giorno 5	0	0%	0	0%	3	7,14%	3	7,14%	0,0985

Tabella 1: Dati comportamentali (frequenza assoluta e percentuale) delle scrofe del gruppo trattato (28 scrofe, una scrofa rimossa al giorno 1 per zoppia grave dovuta allo spostamento) e del gruppo controllo (42 scrofe) ai diversi giorni di trattamento, divisi in comportamenti negativi e positivi.
Table 1: Behavioral data (absolute frequency and percentage) of the sows of the treated group (28 sows, one sow removed on day 1 for severe lameness due to displacement) and of the control group (42 sows) on several days of treatment, divided into negative and positive behaviors.

Lesioni cutanee scrofe. Le lesioni cutanee sono state valutate ai giorni 0, 1, 3, e 5 di trattamento. Le lotte per la formazione della gerarchia nel box dinamico sono state significativamente maggiori (P<0,05) nel gruppo controllo rispetto a quello trattato al giorno 3 e al giorno 5 di trattamento (Tabella 2).

	Gruppo trattato		Gruppo controllo		P-value
Giorno 0	0	0%	0	0%	0,3857
Giorno 1	3	11,1%	12	28,6%	0,1348
Giorno 3	5	18,5%	20	47,6%	0,0165
Giorno 5	5	18,5%	23	54,7%	< 0,0001

Tabella 2: Lesioni cutanee (frequenza assoluta e percentuale) delle scrofe del gruppo trattato (28 scrofe, una scrofa rimossa al giorno 1 per zoppia grave dovuta allo spostamento) e del gruppo controllo (42 scrofe) ai diversi giorni di trattamento.
Table 2: Skin lesions (absolute and percentage frequency) of the sows of the treated group (28 sows, one sow removed on day 1 for severe lameness due to displacement) and of the control group (42 sows) on several days of treatment.

Zoppie scrofe. La valutazione delle zoppie è stata effettuata ai giorni 0, 1, 3 e 5 di trattamento. I dati ottenuti mostrano che le interazioni negative tra le scrofe del gruppo controllo hanno portato a un significativo (P<0,05) aumento delle zoppie (soprattuto di livello 1), rispetto al gruppo trattato in particolare al giorno 3 e 5 di trattamento (Tabella 3).

	Gruppo trattato		Gruppo controllo		P-value
Giorno 0	1	3,6%	0	0%	0,4118
Giorno 1	1	3,7%	7	16,7%	0,1302
Giorno 3	2	7,4%	14	33,3%	0,0175
Giorno 5	2	7,4%	17	40,5%	0,0042

Tabella 3: Zoppie (frequenza assoluta e percentuale) delle scrofe del gruppo trattato (28 scrofe, una scrofa rimossa al giorno 1 per zoppia grave dovuta allo spostamento) e del gruppo controllo (42 scrofe) ai diversi giorni di trattamento.
Table 3: Lame (absolute frequency and percentage) of the sows of the treated group (28 sows, one sow removed on day 1 for severe lameness due to displacement) and of the control group (42 sows) on several days of treatment.

Dati comportamentali suinetti. Sono stati valutati i comportamenti positivi e negativi dei due gruppi di suinetti al momento del rimescolamento, dopo 6 ore e dopo 24 ore. I comportamenti negativi nel gruppo controllo sono risultati significativamente (P<0,05) maggiori rispetto a quelli del gruppo trattato. I comportamenti positivi sono stati maggiori sia al momento del rimescolamento, si dopo 6 e 24 ore dal rimescolamento nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo (Tabella 4).

	Gruppo trattato				Gruppo controllo				P-value
	Comportamenti negativi		Comportamenti positivi		Comportamenti negativi		Comportamenti positivi		
Rimescolamento	9	2,7%	9	2,7%	36	10,1%	3	0,83%	0,0001
Dopo 6 ore	2	0,6%	39	11,8%	35	9,8%	14	3,9%	< 0,0001
Dopo 24 ore	4	1,2%	47	14,2%	16	4,5%	8	2,2%	< 0,0001

Tabella 4: Dati comportamentali (frequenza assoluta e percentuale) dei suinetti del gruppo trattato (331 suinetti) e del gruppo controllo (358 suinetti) al momento del rimescolamento, dopo 6 e dopo 24 ore, divisi in comportamenti negativi e positivi.
Table 4: Behavioral data (absolute frequency and percentage) of piglets in the treated group (331 piglets) and control group (358 piglets) at the time of shuffle, after 6 and after 24 hours, divided into negative and positive behaviors.

Morsicatura della coda suinetti. È stato valutato il livello di morsicatura della coda nei due gruppi di suinetti al giorno 0, 7, 14, 21 e 28. Nel gruppo trattato non vi sono stati fenomeni di morsicatura della coda, nonostante ci fosse la presenza di necrosi della punta della coda, mentre nel gruppo controllo il fenomeno della morsicatura ha iniziato a manifestarsi dal giorno 14 fino al giorno 28. Vi è stata una riduzione statisticamente significativa (P<0,05) del fenomeno della morsicatura della coda al giorno 21 e al giorno 28 di trattamento (Tabella 5).

	Gruppo trattato		Gruppo controllo		P-value
Giorno 0	0	0%	0	0%	1
Giorno 7	0	0%	0	0%	1
Giorno 14	0	0%	4	1,1%	0,1251
Giorno 21	0	0%	10	2,9%	0,002
Giorno 28	0	0%	12	3,5%	<0,0001

Tabella 5: Morsicatura della coda (frequenza assoluta e percentuale) dei suinetti del gruppo trattato (331 suinetti) e del gruppo controllo (358 suinetti fino al giorno 7, 350 al giorno 14, 347 al giorno 21 e 344 al giorno 28 per mortalità) ai diversi giorni di trattamento.
Table 5: Tail biting (absolute and percentage) of piglets in the treated group (331 piglets) and control group (358 piglets up to day 7, 350 on day 14, 347 on day 21 and 344 on day 28 for mortality) on the different days of treatment.

Mortalità suinetti. La mortalità è stata valutata al giorno 28 di trattamento. Non sono stati presi in considerazione gli animali abbattuti. I dati non sono risultati statisticamente significativi (Tabella 6).

	Gruppo trattato		Gruppo controllo		P-value
Mortalità	8	2,5%	14	3,9%	0,2868

Tabella 6: Mortalità (frequenza assoluta e percentuale) dei suinetti del gruppo trattato (331 suinetti) e del gruppo controllo (358 suinetti) al giorno 28 del trattamento.
Table 6: Mortality (absolute frequency and percentage) of piglets in the treated group (331 piglets) and control group (358 piglets) on day 28 of treatment.

DISCUSSIONE

L'applicazione del PAP tramite diffusore si è dimostrata una via molto semplice ed efficace per far fronte agli stati di stress prolungati, come il periodo post svezzamento, nell'ambito dell'allevamento intensivo tradizionale. L'applicazione del PAP in forma spray invece è risultata più adatta a far fronte a momenti di stress più puntuali come il rimescolamento delle scrofe. Nell'allevamento in cui si è svolto questo studio le scrofe venivano inserite, a seguito dell'inseminazione artificiale, all'interno di una gestazione dinamica. In questo caso a causa del continuo inserimento di nuovi animali all'interno di un gruppo con una numerosità elevata sono stati applicati anche dei diffusori all'interno della gestazione, oltre all'applicazione dello spray sulle scrofe di nuovo inserimento. Infatti a differenza della gestazione in box nella quale l'aggressività è più presente i primi 5 giorni, ma va via via diminuendo con lo stabilirsi della gerarchia, nella gestazione dinamica l'equilibrio gerarchico è continuamente messo alla prova dall'inserimento settimanale di nuove scrofe gestanti.

Nonostante dai risultati sul comportamento delle scrofe si evidenzi una riduzione dei comportamenti negativi solo al giorno 1 dal rimescolamento, i dati raccolti indicano una significativa riduzione delle lesioni cutanee e delle zoppie al giorno 3 e al giorno 5 del trattamento. Probabilmente questa mancanza di significatività statistica è dovuta alla bassa numerosità delle scrofe prese in considerazione in questo studio.

In generale, la diminuzione dell'aggressività post rimescolamento conferma i dati di un precedente lavoro di K. Plush et al. 2015 [8] svolto però in un sistema di gestazione tradizionale (svezzamento e rimescolamento di piccoli gruppi di scrofe).

I dati ottenuti risultano anche più rilevanti se si considera l'applicazione in un sistema di gestazione dinamico nel quale l'inserimento settimanale di scrofe induce un continuo ristabilirsi della gerarchia, con conseguente aggressività. Infatti, a differenza della gestazione in box nella quale l'aggressività è più presente i primi 5 giorni, ma va via via diminuendo con lo stabilirsi della gerarchia, nella gestazione dinamica l'equilibrio gerarchico è continuamente messo alla prova dall›inserimento settimanale di nuove scrofe gestanti.

Per quanto riguarda i suinetti, i dati comportamentali raccolti nel post svezzamento indicano una riduzione statisticamente significativa dei comportamenti negativi nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo al momento del rimescolamento, dopo 6 ore e dopo 24 ore a differenza di quanto riscontrato in un precedente lavoro di D. Temple et al. 2016 [9] dove era stata dimostrata una riduzione dei comportamenti negativi solo nelle prime 6 ore post svezzamento ma non dopo le 24 ore.

I dati sulla morsicatura della coda sono risultati statisticamente significativi al giorno 21 e 28 del trattamento. Infatti, nel gruppo trattato erano presenti degli animali con necrosi della coda che però non ha mai esitato in lesioni sanguinolente da morsicatura a differenza del gruppo controllo. Questo dato risulta essere particolarmente rilevante visto il crescente interesse verso il fenomeno della morsicatura della coda e le sue conseguenze sul benessere degli animali. Infatti, il 10/02/2023 sono state introdotte delle novità legislative a livello europeo per quanto riguarda il taglio della coda. gli allevatori di suini che, in deroga, intendono continuare temporaneamente a detenere animali con coda tagliata sono tenuti, oltre al rispetto dei requisiti del D. Lgs 122/2011 e del D. Lgs 146/2001 e alla presenza in allevamento di almeno un gruppo a coda lunga, a individuare un percorso gestionale e/o strutturale migliorativo delle condizioni di allevamento con particolare riferimento a quelle finalizzate a prevenire i fenomeni di morsicatura della coda [10] con l'obbiettivo di detenere in allevamento solo animali a coda integra.

Infine, i dati raccolti sulla mortalità dei suinetti al termine dei 28 giorni di trattamento non è stata statisticamente rilevante.

È importante ricordare che, nonostante i risultati positivi ottenuti in questo studio dall'utiliz-

zo dei PAP, la morsicatura della coda e l'aggressività delle scrofe sono delle problematiche multi fattoriali che dipendono da:

- fattori ambientali;
- fattori gestionali;
- presenza di patologie.

I feromoni, quindi, non sono da considerarsi come la soluzione in assoluto di questo tipo di problematiche all'interno degli allevamenti intensivi tradizionali, ma come uno strumento utile all'allevatore per migliorare il benessere dei propri animali.

CONCLUSIONI

Lo svezzamento e il rimescolamento delle scrofe in gestazione sono due dei momenti più critici per lo stress nell'allevamento suino moderno. Il nuovo quadro normativo impone il divieto di taglio della coda nei suinetti e l'allevamento della scrofa gestante in gruppo.
Di conseguenza questi momenti già di per sé stressanti per gli animali diventano anche critici per quanto riguarda l'aggressività e le lesioni. I sintetici dei feromoni appaganti materni suini si sono confermati un valido strumento per la riduzione delle interazioni sociali negative e dell'aggressività nei suinetti in svezzamento e nelle scrofe gestanti. Ulteriori studi sono necessari nella tipologia di allevamento italiana per valutare le ulteriori applicazioni di questo prodotto.

BIBLIOGRAFIA

1. Maggie, H., 2021. Tail-biting in pigs: a scoping review. Animals. Doi.org/10.3390/anil1072002.
2. Kongsted, A.G., 2004. Stress and fear as possible mediator of reproduction problem in group housed sows: a review. Acta Agriculturae Scandinavica. Section A-Anim.Sci. 54,58-66.
3. McGlone, J.J., Anderson, D.L., 2002. Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behavior and weight gain in weaned pigs. J. Anim. Sci. 80, 3179-3183.
4. Kirkwood, R.N., Forbes, J.M. Hughes, P.E., 1981. Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs. J. Reprod. Fertil. 61, 193-196.
5. Pearce, G.P., Hughes, P.E., 1987. An investigation of the roles of boar-component stimuli in the expression of proceptivity in the female pig. Appl. Anim. Behav. Sci. 18, 287-299.
6. Albertini, M., 2008. Etologia applicata e benessere animale, vol. 1-parte generale.
7. Frank, D., Beauchamp, G., Palestrini, C., 2010. Systematic review of the use of pheromones for treatment of undesirable behavior in cats and dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 236, 1308-1316.
8. Grandin, T., 1998. Behavioral genetics and animal science. 1-40.
9. European Commission: Pigs report, 1997.
10. Lawrence, A.B., Terlouw, E.M.C., 1993. A review of the behavioral factors involved in the development and continued performance of stereotypic behaviors in pigs. Journal of animal science. 2815-2825.

POLMONITE SUINA: LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO QUALE AUSILIO ALLA DIAGNOSI ANATOMOPATOLOGICA

SWINE PNEUMONIA: NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY AS AN AID TO ANATOMOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS

RECCHIA M.[1], VARRA' M.O.[2], FORMENTI N.[1], TONNI M.[1], MAISANO A.M.[1], ZANARDI E.[2], CONTER M.[3], GHIDINI S.[4], IANIERI A.[2], ALBORALI G.L.[1]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) Bruno Umbertini;*
[2] *Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma, Strada del Taglio 10, 43126 Parma, Italia;*
[3] *Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma, Strada del Taglio 10, 43126 Parma, Italia;*
[4] *Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università degli Studi di Milano, Via dell'Università 6, 26900 Lodi, Italia*

Parole chiave: spettroscopia NIR, PRDC, necroscopia
***Keywords*:** NIR spectroscopy, PRDC, necropsy

Riassunto
Una classificazione accurata delle lesioni polmonari in sede necroscopica è essenziale per impostare un iter diagnostico efficace, chiave del successo nella gestione e prevenzione della malattia respiratoria negli allevamenti suinicoli. L'impiego di tecniche analitiche rapide e non distruttive, come la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR), potrebbe rilevarsi utile a perseguire tale obiettivo. Il presente studio ha indagato il potenziale della spettroscopia NIR nel differenziare il tessuto polmonare suino normale, congesto e patologico, e nel distinguere tra loro diversi modelli di flogosi polmonare, ovvero la broncopolmonite catarrale, la pleuropolmonite fibrinosa, e la polmonite interstiziale. In totale sono stati analizzati 101 polmoni di suini svezzati utilizzando uno spettrometro portatile, e gli spettri NIR acquisiti sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata. I risultati ottenuti hanno evidenziato notevoli capacità di classificazione in relazione ai diversi pattern di polmonite. È stata inoltre osservata un›efficace discriminazione tra tessuto polmonare normale e patologico, mentre sono emerse maggiori difficoltà nel classificare correttamente i campioni in preda a congestione polmonare. Questo studio dimostra il potenziale applicativo della spettroscopia NIR quale ausilio nella pratica diagnostica veterinaria.

Abstract
Respiratory diseases seriously affect pig farming, resulting in significant production losses and increased antimicrobial use. Accurate classification of lung lesions at necropsy is essential for effective diagnostics, and the use of rapid, non-destructive analytical techniques, such as near-infrared (NIR) spectroscopy, could be beneficial. The present study investigated the potential of NIR spectroscopy in differentiating between normal, congested, and pathological pig lung tissues, and in distinguishing between different patterns of pneumonia, including catarrhal bronchopneumonia, fibrinous pleuropneumonia, and interstitial pneumonia. In total, 101 lungs from weaned pigs were analyzed using a portable spectrometer, and the acquired NIR spectra were subjected to multivariate statistical analysis. Our results showed remarkable classification performances in differentiating between different pneumonia models. Effective discrimination

between normal and pathological lung tissues was also observed, while greater difficulties emerged in correctly classifying congested lung samples. This study demonstrates the potential applicability of NIR spectroscopy as an aid in veterinary diagnostic practice.

INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria suina (Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC) rappresenta una delle principali cause di perdite produttive e di consumo di antimicrobici negli allevamenti suinicoli intensivi, con gravi implicazioni per la salute e il benessere animale. La combinazione di fattori predisponenti e di caratteristiche intrinseche degli animali compromette i meccanismi difensivi dell'apparato respiratorio, favorendo l'insorgenza di polmoniti ad eziologia polimicrobica (1). Considerata tale natura multifattoriale, la gestione della PRDC richiede un approccio multidisciplinare. I dati clinici e i risultati dei test diagnostici condotti in vivo devono essere integrati con le informazioni ottenute dagli esami *post-mortem*. L'indagine anatomopatologica è in questo contesto essenziale per strutturare l'intero iter diagnostico, permettendo di selezionare gli esami di laboratorio più appropriati per giungere ad una diagnosi eziologica (2).

La categorizzazione delle lesioni polmonari sulla base di modelli morfo-patologici macroscopici aiuta a delineare il sospetto diagnostico, sebbene non sia raro il riscontro di quadri lesivi misti e singoli patogeni possano essere associati a diversi tipi di lesioni (3). Tra i modelli descritti, la broncopolmonite catarrale (BPC), la pleuropolmonite fibrinosa (PPF) e la polmonite interstiziale (PI) sono di frequente riscontro in sede necroscopica nella specie suina. La BPC, caratterizzata macroscopicamente da consolidamento dei lobi cranioventrali e dalla presenza di essudato biancastro nel lume delle vie aeree, è tipica dell'infezione polmonare da *Mycoplasma hyopneumoniae* (4). La PPF suina è invece associata all'infezione polmonare da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (5). Le aree colpite appaiono di colore rosso scuro-nerastro e presentano consistenza aumentata. Focali o multifocali focolai necrotico-emorragici possono essere riscontrati nella porzione dorsocaudale dei lobi diaframmatici e la superficie pleurica risulta ricoperta da fibrina nei quadri acuti (3). Infine, la PI è tipica di infezioni virali e coinvolge diffusamente l'organo colpito. Macroscopicamente, i polmoni non collassano all'apertura del torace, presentano consistenza aumentata e una dilatazione dei setti interlobulari dovuta all'edema interstiziale (2).

La valutazione macroscopica ed istologica dei tessuti polmonari affetti è basilare per formulare una diagnosi morfologica, ma la disponibilità di tecniche analitiche non distruttive per ottenere una conferma in tempi rapidi potrebbe rivelarsi estremamente vantaggiosa. Tali metodiche potrebbero inoltre ottimizzare il monitoraggio della salute e del benessere animale presso i macelli, considerati punti di controllo strategici per valutare l'impatto delle malattie respiratorie nei siti d'ingrasso (6,7).

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) è da tempo impiegata in contesti quali l'industria agroalimentare e farmaceutica. Essa misura l'interazione tra la radiazione elettromagnetica NIR e le molecole presenti in un campione, restituendo una "impronta digitale spettrale" che include informazioni complete relative alla composizione e alle condizioni della matrice analizzata (8). Teoricamente, tale principio potrebbe essere sfruttato per riconoscere pattern distintivi specifici delle diverse lesioni polmonari, facilitando l'identificazione rapida ed accurata dei diversi modelli morfo-patologici.

Per questi motivi, il presente studio ha voluto indagare l'applicabilità della spettroscopia NIR quale soluzione innovativa nella valutazione e classificazione delle lesioni polmonari in suini sottoposti a necroscopia.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 101 polmoni in buono stato di conservazione prelevati da suini svezzati di

peso inferiore a 50 kg e conferiti presso la Sezione Diagnostica dell'IZSLER di Brescia per gli esami *post-mortem*. In sede necroscopica, per ciascun polmone è stata formulata una diagnosi morfologica macroscopica mediante ispezione visiva e palpazione.
La valutazione spettroscopica ha riguardato tre modelli di polmonite acuta, ovvero la BPC, la PPF e la PI. Ai fini dell'analisi spettroscopica, sono state incluse anche porzioni di tessuto normale (ovvero sano, N) e congesto (C), riscontrate in organi lesionati o in polmoni non patologici. Gli spettri NIR sono stati registrati nella regione dell'infrarosso compresa tra 908 e 1676 nm utilizzando uno strumento portatile (MicroNIR OnSite-W, Viavi Solutions, Santa Rosa, CA, USA). Le aree N, C o patologiche (P) dei polmoni sono state scansionate posizionando lo strumento perpendicolarmente alla superficie dell'organo, come rappresentato in figura 1, e per ogni area analizzata sono stati acquisiti otto spettri ruotando leggermente il dispositivo dopo ciascuna scansione.

Figura 1. Acquisizione degli spettri NIR del tessuto polmonare suino tramite spettrometro NIR portatile.
Figure 1. NIR spectra recording of swine lung tissues using a portable NIR spectrometer.

Prima di condurre l'analisi dei dati, è stata effettuata una valutazione approfondita degli spettri NIR acquisiti e si è resa necessaria una loro processazione preliminare al fine di migliorare la qualità e la robustezza delle analisi successive.
L'analisi statistica multivariata, consistente nell'analisi discriminante dei minimi quadrati parziali ortogonali (*Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*, OPLS-DA), è stata utilizzata allo scopo di sviluppare modelli di classificazione in grado di discriminare le diverse categorie di tessuto polmonare, cercando di stabilire una relazione tra gli spettri NIR e le diagnosi morfologiche macroscopiche. A questo fine, sono stati sviluppati due modelli OPLS-DA distinti:

- Modello 1, creato con l'obiettivo di distinguere tra i tessuti polmonari N, C e P (comprendente le tre tipologie infiammatorie);
- Modello 2, relativo ai soli spettri dei tessuti patologici, creato per discriminare tra le lesioni polmonari presenti in corso di BPC, PPF e PI.

RISULTATI
La valutazione spettroscopica dei polmoni selezionati ha permesso di ottenere un totale di 1298 spettri NIR grezzi, ripartiti nelle differenti categorie tissutali come riportato in tabella 1.

Tabella 1. Distribuzione degli spettri NIR acquisiti nelle diverse categorie di tessuto polmonare suino.
Table 1. Distribution of NIR spectra across lung tissue categories.

Categoria di tessuto polmonare	N. spettri NIR acquisiti
N	419
C	291
BPC	451
PPF	113
PI	24

I grafici di dispersione (figure 2 e 3), ottenuti in seguito all'applicazione dell'analisi discriminante OPLS-DA, permettono di visualizzare gli spettri NIR acquisiti ripartiti nelle differenti categorie tissutali all'interno di un piano bidimensionale, definito dalle prime due componenti predittive estratte rispettivamente dal Modello 1 (figura 2) e dal Modello 2 (figura 3). In figura 2, si osservano cluster uniformi per ciascuna categoria di tessuto polmonare (N, C, P), ad eccezione di un'area di sovrapposizione centrale tra campioni appartenenti alle diverse categorie tissutali. La maggior parte degli spettri NIR associati al tessuto polmonare congesto si collocano in posizione intermedia tra le categorie N e P.
Analogamente, in figura 3, gli spettri associati ai diversi modelli di polmonite tendono a clusterizzare in tre gruppi distinti. Si noti che la separazione dei campioni PI è risultata particolarmente pronunciata, nonostante la limitata casistica. Un certo grado di sovrapposizione è stato invece osservato per i campioni BPC e PPF.

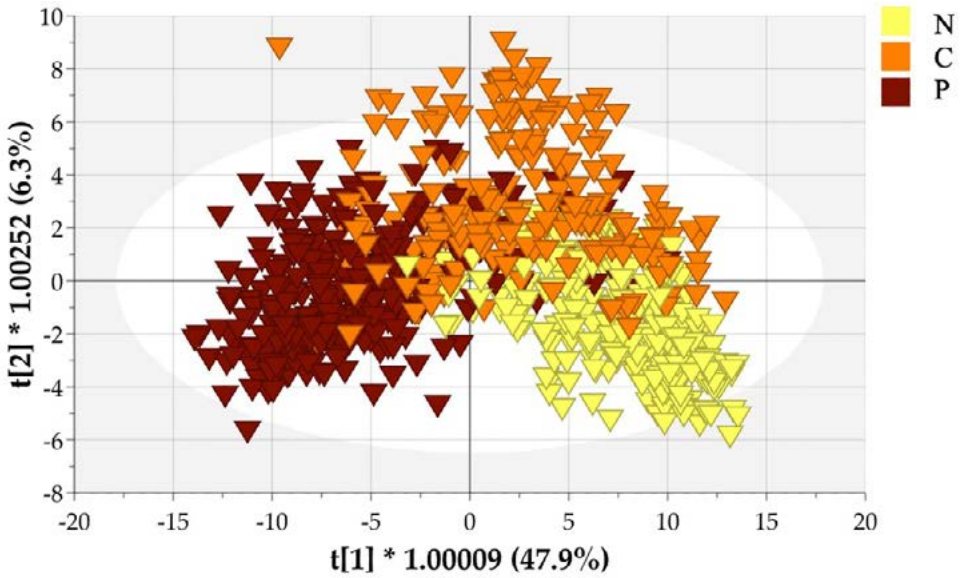


Figura 2. Grafico di dispersione ottenuto dall'analisi OPLS-DA del Modello 1 per la discriminazione del tessuto polmonare normale (N), congesto (C) e patologico (P).
Figure 2. OPLS-DA score scatter plot of the Model 1 for the discrimination of N, C, and P lung tissues.

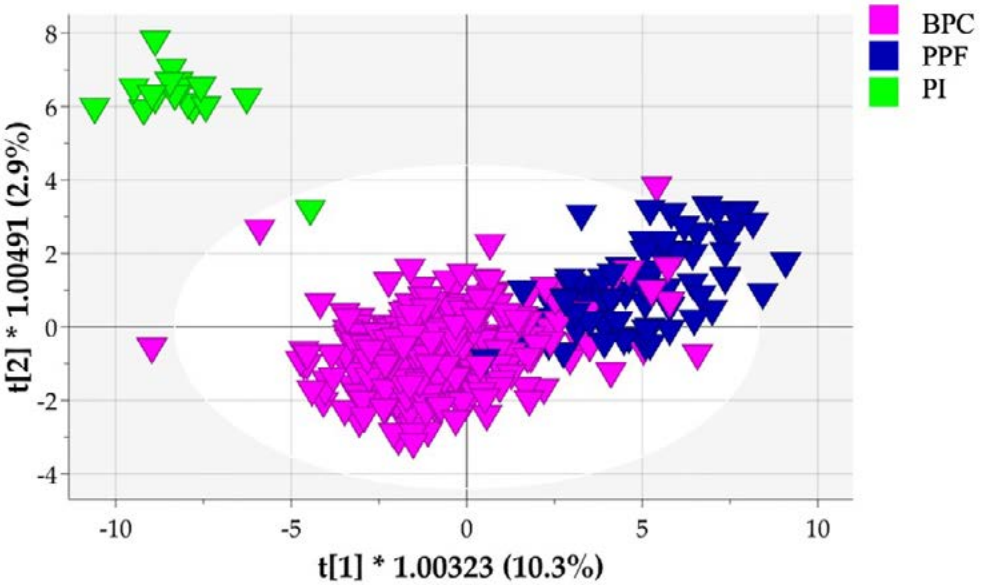


Figura 3. Grafico di dispersione ottenuto dall'analisi OPLS-DA del Modello 2 per la discriminazione dei tessuti polmonari in corso di broncopolmonite catarrale (BPC), pleuropolmonite fibrinosa (PPF) e polmonite interstiziale (PI).
Figure 3. OPLS-DA score scatter plot of the Model 2 for the discrimination of CBP, FPP, and IP lung tissues.

DISCUSSIONE

Il presente studio ha indagato per la prima volta l'applicabilità della spettroscopia NIR nel differenziare diverse tipologie di tessuto polmonare suino in sede necroscopica.

È stato sviluppato un primo modello di classificazione per differenziare polmoni N, C e P utilizzando gli spettri NIR raccolti su tali categorie di tessuto (Modello 1). Come mostrato in figura 2, sono emersi cluster distinti per ciascuna tipologia tissutale, evidenziando l'effettiva applicabilità del modello. Tuttavia, è stata osservata un'area di sovrapposizione centrale tra campioni appartenenti a categorie diverse, che suggerisce la presenza di caratteristiche spettrali condivise tra i tessuti analizzati. Bisogna però considerare che, in questo studio, la diagnosi morfologica è stata formulata esclusivamente mediante una valutazione macroscopica dei polmoni, e che informazioni diagnostiche più dettagliate, come quelle ottenute dall›istopatologia, avrebbero contribuito a un›assegnazione più precisa di ciascun campione alla categoria tissutale corretta, migliorando così le metriche di calibrazione del modello. Infatti, data la complessa istoarchitettura polmonare, non è raro il riscontro di reperti istologici variegati in lobuli polmonari contigui (1). È quindi plausibile che all›interno dell›area scansionata dallo spettrometro portatile, pari a circa 1,5-2 cm^2, gli spettri NIR acquisiti possano aver intercettato lobuli appartenenti a categorie di tessuto polmonare diverse e macroscopicamente indistinguibili.

I campioni di tessuto polmonare C si sono posizionati tra i campioni N e P (figura 2), suggerendo caratteristiche spettrali intermedie a tali categorie tissutali. La congestione polmonare è caratterizzata da un aumento del volume ematico nei polmoni e può avere diverse cause, tra cui la stasi ematica conseguente a disturbi cardiovascolari (iperemia passiva) e l'aumento del flusso ematico a causa della dilatazione di arteriole e capillari in

corso di flogosi acuta (iperemia attiva) (10). La maggiore quantità di sangue nel polmone, e quindi di eritrociti e macromolecole, può giustificare la separazione dei campioni C da quelli N, mentre il loro posizionamento tra i tessuti polmonari N e P potrebbe riflettere la normale evoluzione della polmonite.
Il Modello 2 è stato invece sviluppato con l'obiettivo di distinguere diversi modelli di infiammazione polmonare (BPC, PPF, PI). Anche in questo caso, il grafico riportato in figura 3 mostra cluster distinti per ciascuna categoria di tessuto patologico, nonostante un certo grado di sovrapposizione tra i campioni BPC e PPF. Tali modelli di polmonite vengono descritti come entità distinte, ma nella pratica diagnostica non è raro il riscontro di scenari misti in cui reperti della BPC coesistono con lesioni tipiche della PPF. Di conseguenza, l'utilizzo dell'istopatologia rimarrà imprescindibile per una futura migliore calibrazione del modello. La separazione dei campioni PI dai campioni BPC e PPF è invece risultata particolarmente pronunciata (figura 3). I caratteri tipici dell'infiammazione interstiziale sono profondamente diversi da quelli di altri modelli di polmonite e questo può giustificare i risultati ottenuti. Mentre la BPC e la PPF acute sono caratterizzate principalmente da essudazione (catarrale o fibrinosa) e infiltrazione cellulare (per lo più neutrofili e macrofagi) all'interno degli alveoli e nel lume delle vie aeree, la PI mostra alterazioni che coinvolgono primariamente l'interstizio peribronchiolare, perivascolare e perilobulare. Nei casi acuti, i setti alveolari e interlobulari risultano espansi dall'edema e da abbondanti infiltrati linfoplasmacellulari, mentre un'intensa fibrosi interstiziale è tipica dell'evoluzione cronica (10).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente studio, sebbene preliminari, dimostrano le potenzialità applicative della spettroscopia NIR nella categorizzazione dei tessuti polmonari suini in sede necroscopica e offrono prospettive per strategie diagnostiche innovative ed efficaci. L'impiego di questa tecnologia potrebbe rivelarsi vantaggioso non solo nei laboratori diagnostici, ma anche in relazione alle attività ispettive condotte presso i macelli. La valutazione sistematica ed oggettiva delle caratteristiche del tessuto polmonare dei suini macellati potrebbe infatti generare un flusso informativo utile per studi epidemiologici e per migliorare la gestione della PRDC negli allevamenti. Sono dunque necessari studi aggiuntivi per valutare l'applicazione della spettroscopia NIR in tale contesto.

BIBLIOGRAFIA

1. Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G. (2011) Polymicrobial Respiratory Disease in Pigs. *Anim. Health Res. Rev.* 12, 133–148.
2. 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.
3. Ruggeri, J., Salogni, C., Giovannini, S., Vitale, N., Boniotti, M.B., Corradi, A., Pozzi, P., Pasquali, P., Alborali, G.L. (2020) Association Between Infectious Agents and Lesions in Post-Weaned Piglets and Fattening Heavy Pigs With Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Front. Vet. Sci. 7, 636.
4. Pieters, M.; Maes, D. Mycoplasmosis. In Diseases of Swine, 11th ed.; Zimmerman J. J., Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J.; State University Press: Ames, IA, USA, 2019; pp. 863-883.
5. Gottschalk, M., Broes, A. Actinobacillosis. In Diseases of Swine, 11th ed.; Zimmerman J. J., Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J.; State University Press: Ames, IA, USA, 2019; pp. 749–766.

6. Maes, D., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., Segalés, J., de Oliveira, L.G. (2023) Review on the Methodology to Assess Respiratory Tract Lesions in Pigs and Their Production Impact. *Vet. Res.* 54, 8.
7. Paz-Sánchez, Y., Herráez, P., Quesada-Canales, Ó., Poveda, C.G., Díaz-Delgado, J., Quintana-Montesdeoca, M.D.P., Stefanova, E.P., Andrada, M. (2021) Assessment of Lung Disease in Finishing Pigs at Slaughter: Pulmonary Lesions and Implications on Productivity Parameters. Animals. 11, 3604.
8. Pasquini, C. (2018) Near Infrared Spectroscopy: A Mature Analytical Technique with New Perspectives – A Review. Anal. Chim. Acta. 1026, 8–36.
9. Scanziani, E., Mandelli, G., Radaelli, E. Apparato Respiratorio. In Trattato di Anatomia patologica veterinaria, 4a Edizione; Guarda, F., Mandelli, G., Biolatti, B., Scanziani, E. UTET scienze mediche, 2013; pp. 297–344.
10. Caswell J. L., Williams K. J. Respiratory System. In Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals, 6th edition; Maxie M. G., Elsevier, 2016; Vol. 2, pp. 465–591.

VERIFICA DELL'ERUZIONE DENTALE NEI SUINETTI ALLO SVEZZAMENTO: POSSIBILI INDICATORI DI BENESSERE ANIMALE

DENTAL ERUPTION TIMING IN PIGLETS AT WEANING: A POSSIBLE ANIMAL-BASED MEASURE OF ANIMAL WELFARE

RAINERI S.[1], GAZZOLA A.[1], VEZZOLI F.[1], ARIOLI E.[2], SANTUCCI V.U.[3], CASTELLUCCIO D.[3], SANTUCCI G.[1], TONNI M.[1], SCALI F.[1], LORENZI V.[1], ALBORALI G.L.[1], MAISANO A.M.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) Bruno Umbertini;*
[2]*Libero professionista;*
[3]*Ministero della Salute*

Parole chiave: suinetti, svezzamento, denti
***Keywords*:** piglets, weaning, teeth

Riassunto
Lo scopo dello studio è stato quello di verificare la tempistica dell'eruzione dentale decidua nei suinetti ibridi al fine di trovare degli indicatori utili a stimarne l'età allo svezzamento. Lo studio si è articolato in una fase longitudinale atta a verificare la presenza di possibili indicatori, ed una trasversale finalizzata ad ampliare la casistica. Nello studio longitudinale l'eruzione dentale di 22 suinetti è stata monitorata dalla terza alla quinta settimana di età. A 21 giorni (età limite per lo svezzamento in impianti specializzati), il 100% dei suinetti presentava il premolare $(p)^3$, canino $(c)^1$, incisivo $(i)^3$ e i^1 a livello mascellare e p_3 (97,7%), p_4, c_1, i_3 e i_1 a livello mandibolare. i^1 mascellare e p_3 mandibolare sembrano essere indicatori promettenti per l'età limite di 21 giorni. A 28 giorni (età limite per lo svezzamento ordinario), tutti i suini presentavano p^4_4, p^3_3, c^1_1, i^3_3 e i^1_1 a livello mascellare e mandibolare. La presenza di p^4 mascellare sembra essere un buon indicatore per il cut-off di 28 giorni. Nello studio trasversale 87 suini deceduti provenienti da 27 allevamenti sono stati ispezionati per p^4 e i^1 mascellare e p_3 mandibolare, confermando le osservazioni dello studio longitudinale. Sebbene questi risultati debbano essere confermati su un campione più ampio, l'osservazione dell'eruzione dentaria sembra essere un indicatore promettente, oggettivo e fattibile per valutare il rispetto dell'età di svezzamento dei suinetti.

Abstract
A good management of animal welfare, in respect of the European Law, during the piglets weaning plays a key role in the productive success of the swine farm. The present study aimed at verifying if deciduous dental eruption could be a feasible and objective indicator for estimating the piglets' weaning age. The present study consisted of two phases: a first longitudinal study, followed by a cross-sectional study. The longitudinal study was conducted on 22 piglets, from their 3rd to 5th week of age. Maxillary incisor (i^1) and mandibular premolar (p_3) appeared to be good indicators of the age of 21 days, whereas maxillary premolar (p^4) of the age of 28 days. The cross-sectional study was then conducted on 87 piglets' carcasses from 27 swine farms, and confirmed the previous observations. Even though further studies on a higher number of animals are required, our results suggest that the observation of the deciduous dental eruption could be a promising feasible indicator for estimating the piglets' age, in compliance with the animal welfare.

INTRODUZIONE

Nel contesto delle realtà zootecniche il benessere animale e la sua salvaguardia in allevamento rappresenta un tema di particolare interesse ed importanza sia nel dibattito pubblico che nella comunità scientifica. Le attenzioni che vengono rivolte verso le tematiche sul benessere animale da parte del consumatore rappresentano un punto fondamentale per quanto riguarda la scelta di mercato. Essa, infatti, è sempre più orientata ad un prodotto che sia il più sostenibile possibile e che attraverso le sue filiere ne garantiscano un elevato standard di benessere durante tutto il ciclo produttivo (Alonso et al., 2020).

Tra le fasi di allevamento, lo svezzamento rappresenta uno dei maggiori eventi stressanti per la vita degli animali. In particolare, nel suinetto la gestione di questa fase risulta particolarmente critica data l'insorgenza di patologie infettive che conducono ad una riduzione della performance produttiva con conseguenti perdite economiche per l'allevatore (Campbell et al., 2013). È dunque fondamentale che il suinetto sia fisiologicamente pronto a questo drastico cambiamento. La razione alimentare in questa fase risulta un parametro chiave che deve essere valutato in correlazione ad un corretto sviluppo della dentizione; evento essenziale in questo stadio così delicato (Campbell et al., 2013; Wensley et al., 2021). In particolare, l'eruzione completa dei premolari nei suinetti di età maggiore a 21 giorni risulta essere associata ad una migliore performance produttiva (Tucker et al., 2009).

Nelle realtà produttive, per liberare la sala parto e ottimizzare la gestione dei "posti parto", si ha la necessità di svezzare i suinetti nel minor tempo possibile. Molti studi sono orientati infatti sulle modalità di somministrazione e la tipologia di alimento che permettano di ridurre al massimo i tempi necessari per questo drastico cambio alimentare. A livello legislativo nella Comunità Europea il benessere dei suini in allevamento è normato dalla direttiva 2008/120/CE, secondo la quale nessun suinetto può essere allontanato dalla scrofa al di sotto dei 28 giorni di età, ovvero a 21 giorni ma solo esclusivamente in presenza di impianti specializzati. Pertanto, una stima precisa dell'età del suinetto allo svezzamento permette di verificare il rispetto della norma e di garantire un adeguato livello di benessere animale in questa delicata fase dell'allevamento. A questo riguardo, in assenza di un protocollo, il centro di referenza europeo per il benessere dei suini (EURCAW pigs) ha proposto una stima indiretta basata su indicatori di performance riproduttiva delle scrofe. Tuttavia, questo tipo di valutazione indiretta permette solo di comprendere se mediamente l'età di svezzamento è garantita, tuttavia ha il forte limite di basarsi su delle dichiarazioni dell'operatore. La valutazione del benessere e dei relativi parametri, ove possibile, deve basarsi su osservazioni e misurazioni dirette ed oggettive sugli animali (*animal based measures* - ABM).

La visita clinica e l'esame obbiettivo speciale ortodontico rappresentano un metodo rapido ed indolore che potrebbe essere idoneo alla stima dell'età dell'animale, attraverso una valutazione fenotipica della tavola dentale. Infatti, contrariamente al peso, la dentizione rappresenta un parametro più stabile per la valutazione della crescita poiché meno sensibile alle interferenze nutrizionali (Garn et al., 1965). La dentizione del suino domestico è composta da incisivi (i/I), canini (c/C), premolari (p/P) e molari (m/M), indicati con la lettera minuscola se decidui o maiuscola se permanenti. In particolare, la dentizione decidua del suinetto si compone di 28 denti (2x i 3/3, c 1/1, p 3/3 e m 0/0), sostituiti dalla dentizione permanente a 2 anni, la cui tavola dentaria si compone di 44 denti (2x I3/3, C 1/1, P 3/3 e M 4/4) (Tonge and McCance, 1973). Ad oggi, la produzione scientifica sulla valutazione della tavola dentaria per la stima dell'età nei suini è piuttosto carente. Esistono alcuni studi che hanno coinvolto principalmente razze pure come il Large White (Tonge et al., 1965), lo Yorkshire (Tucker and Widowski, 2009; Tucker et al., 2010), il maiale nero nigeriano (Okandeji et al., 2021) o incroci Large White x Landrace (Wenham and Fower, 1973). Le osservazioni svolte in suini di razza Yorkshire tramite misurazioni effettuate in più momenti (2-35 giorni di vita), hanno mostrato come nel suinetto p3 compaia a 19 giorni di vita, mentre p4 tra il 23° e il 24° giorno (Tucker et al., 2010;

Tucker e Widoski, 2009). L'iniziale occlusione tra p3 e p4 è stata osservata al ventesimo giorno di vita (Tucker et al., 2010). Tuttavia, sono state riportate differenze nell'eruzione dentale in base al sesso e al peso alla nascita (Tucker e Widoski, 2009). In particolare, la comparsa di p3 e p4 è stata evidenziata mediamente prima nella femmina, rispettivamente 19,15 giorni contro 19,59 nel maschio e 23,93 contro 24,94 nel maschio. Inoltre, differenze in base alla razza sono presumibili confrontando altri lavori (Okadeji et al., 2021).
Queste osservazioni sono tuttavia riferite alle sole razze pure e in contesti geografici difficilmente comparabili alla realtà produttiva europea, che invece è basata tradizionalmente sull'utilizzo di ibridi commerciali ad almeno 4 vie per quanto concerne la genetica. Sicuramente la scarsa produzione scientifica sull'argomento a livello nazionale ed europeo evidenzia una lacuna importante, e la metodologia impiegata per la valutazione della tavola dentaria risulta facilmente applicabile con buone prospettive per quanto riguarda l'identificazione di cut-off, ossia parametri oggettivi per stimare l'età dei suinetti nella fase di svezzamento.
L'obbiettivo del presente studio è quello di validare e proporre un protocollo per la stima dell'età dei suinetti, così da verificare che lo svezzamento avvenga nel rispetto della fisiologia, del benessere animale e delle tempistiche previste dalla normativa.

MATERIALI E METODI

Il presente lavoro è stato articolato in due fasi: uno studio longitudinale su una coorte di suinetti e uno studio trasversale effettuato in sala necroscopica.

Studio longitudinale

Per questa fase di studio, sono stati selezionati 22 suinetti appartenenti a 2 scrofe pluripare di un allevamento sito in pianura Padana. L'allevamento selezionato, da riproduzione a ciclo aperto, alleva ibridi commerciali di genetica Topigs® e Danbred® in box parto con gabbie di tipo tradizionale. Il piano alimentare dei suinetti è costituito, oltre al latte materno, anche da latte artificiale ad libitum tramite la linea del latte dal 1° giorno di vita; viene fornito inoltre mangime secco specifico per suinetti sottoscrofa dai 5-6gg e mangime in crema sempre per animali sottoscrofa dai 10-12gg. L'eruzione della dentizione decidua dei suinetti è stata valutata a 16, 20, 23, 27 e 30gg di vita, in accordo con quanto effettuato in studi precedenti (Tucker et al., 2010; Tucker e Widoski, 2009). È stato inoltre rilevato il sesso degli animali e, ad ogni giorno di rilievo, è stato misurato il peso tramite bilancia a gancio con tolleranza di ± 0,1 Kg. L'esame obbiettivo ortodontico è stato condotto dal medesimo valutatore su tutti i suinetti per tutte le giornate di rilievo, mediante l'ausilio di un apribocca veterinario e ponendo l'animale in decubito dorsale. Sono stati valutati i seguenti indicatori: presenza/assenza del dente, eruzione dentale, occlusione dentale. L'analisi statistica (modello di regressione lineare) è stata condotta considerando il singolo suinetto come unità analitica e accorpando i risultati tra emiarcata destra e sinistra per singola tipologia di dente. Il tempo di eruzione del singolo premolare varia in funzione dell'età e l'analisi è stata condotta usando un fattore di correzione tra le due osservazioni (Tucker et al., 2010).

Studio trasversale

La seconda parte del lavoro ha previsto la valutazione dei denti di 87 carcasse di suini appartenenti a 27 allevamenti del Nord Italia conferite presso le sedi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Ogni animale è stato classificato secondo le seguenti categorie: suinetto sottoscrofa <21gg, suinetto sottoscrofa 21-28 gg, suinetto svezzato (>28 gg fino a 10 settimane), suini all'ingrasso (da 10 settimane alla macellazione) in funzione delle dichiarazioni raccolte dall'operatore, dell'allevamento di provenienza e dal peso, i suini per i quali non è stato possibile ottenere il dato non sono stati inclusi nello studio. Di seguito la tabella 1 riporta il dettaglio degli individui campionati.

CATEGORIA	N° suini
SUINETTO SOTTOSCROFA < 21 gg	28
SUINETTO SOTTOSCROFA 21-28 gg	16
SUINETTO SVEZZATO (> 28 gg fino a 10 sett.)	39
SUINI ALL'INGRASSO (da 10 sett – alla macellazione	4
TOTALE CAMPIONI	**87**

Tabella 1 – Categorie delle carcasse di suino esaminate

L'esame ortodontico ha valutato la sola presenza o assenza dei denti che sono stati designati nella precedente fase di studio longitudinale, come possibili indicatori cut-off per la stima dell'età di svezzamento nei suinetti. Nello specifico le osservazioni hanno riguardato gli incisivi mascellari (i^1), i quarti premolari mascellari (p^4) e i terzi premolari mandibolari (p_3). Ogni osservazione è stata condotta dal medesimo valutatore. Sono state calcolate le prevalenze ed i relativi Intervalli di confidenza al 95%. Inoltre, è stato eseguito un test di Fischer al fine di verificare eventuali differenze statisticamente significative tra i gruppi.

RISULTATI

Studio longitudinale

In questa prima fase del nostro studio, la valutazione dell'eruzione dentale ha mostrato innanzitutto come alcuni denti si presentino fin dal primo rilievo a 16gg di vita in tutti i soggetti esaminati; in particolare, i^3, i_3, c^1, c_1, p^3 e i_1. Altri invece hanno mostrato un'emergenza scalare nei giorni successivi come riportato in tabella 2. Il tempo di eruzione del singolo premolare varia in funzione dell'età e l'analisi è stata condotta usando un fattore di correzione tra le due osservazioni. Eventuali differenze sono state indagate tramite un modello di regressione lineare, con limite di significatività P<0,05

GIORNO DI VITA	MAX-p^4	± IC95%	MAX-i^1	± IC95%	MAN-p_4	± IC95%	MAN-p_3	± IC95%
16	0,0%	-	77,3	59,8-94%	97,7	91,5-100%	0,0%	-
20	0,0%	-	95,5%*	86,8-100%	100%	-	18,2%*	2,1-34,3%
23	65,9%*	46,1-85,7%	100%	-	100%	-	97,7%*	91,5-100%
27	100%*	-	100%	-	100%	-	100%	-
30	100%*	-	100%	-	100%	-	100%	-
GIORNO DI VITA	**MAX-p^4**	**± IC95%**	**MAX-i^1**	**± IC95%**	**MAN-p_4**	**± IC95%**	**MAN-p_3**	**± IC95%**
16	0,0%	-	77,3	59,8-94%	97,7	91,5-100%	0,0%	-
20	0,0%	-	95,5%*	86,8-100%	100%	-	18,2%*	2,1-34,3%
23	65,9%*	46,1-85,7%	100%	-	100%	-	97,7%*	91,5-100%
27	100%*	-	100%	-	100%	-	100%	-
30	100%*	-	100%	-	100%	-	100%	-

Tabella 2 – Risultati delle osservazioni circa l'eruzione scalare dei denti decidui nei suinetti a differenti giorni di vita con relativa significatività statistica - i^1 MAX= incisivo 1 mascellare; p_3 MAND= premolare 3 mandibolare; p^4 MAX= premolare 4 mascellare; IC= intervallo di confidenza; *= p<0,05 (max-p^4 20g vs 23g e 23g vs 27g; MAX-i^1 16g vs 20g; MAN-p_3 16g vs 20g e 20g vs 23g).

I grafici 1 e 2 mostrano rispettivamente l'eruzione dentale scalare nei diversi giorni di vita a livello mandibolare e mascellare. La scarsa numerosità dei soggetti reclutati per questa prima parte di studio potrebbe aver influito in tal senso, così come la differente linea genetica degli animali valutati.

Studio trasversale

I risultati ottenuti in questa seconda parte di studio hanno coinvolto 87 carcasse di suino e nella tabella 3 e nel grafico 3 vengono riportate per le differenti categorie di suini le prevalenze percentuali e le loro distribuzioni sulla presenza dei denti valutati, accorpando i risultati tra emiarcata destra e sinistra per singola tipologia di dente.

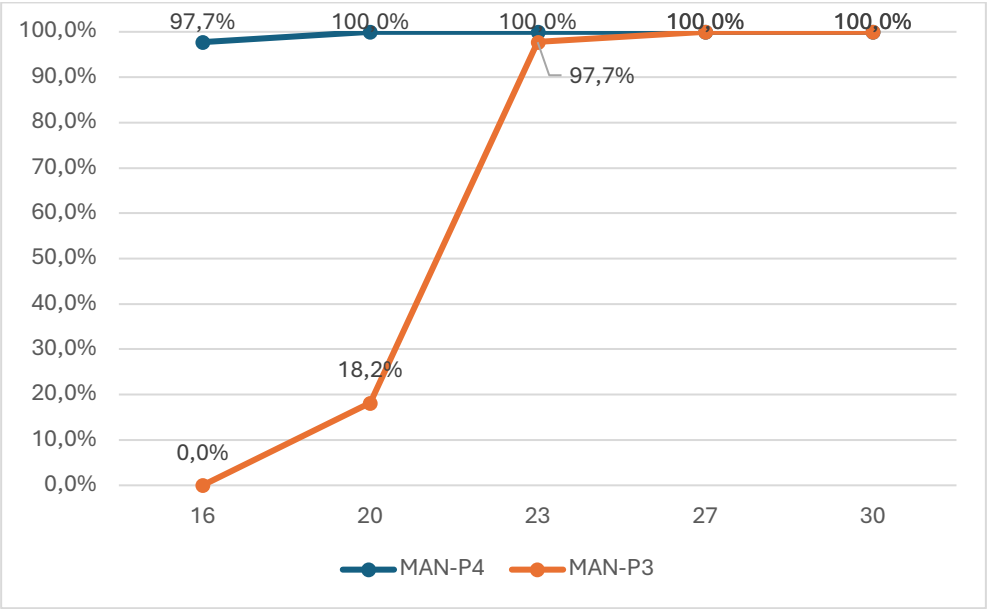


Grafico 1 – Percentuali cumulate di eruzione dentale a livello mandibolare

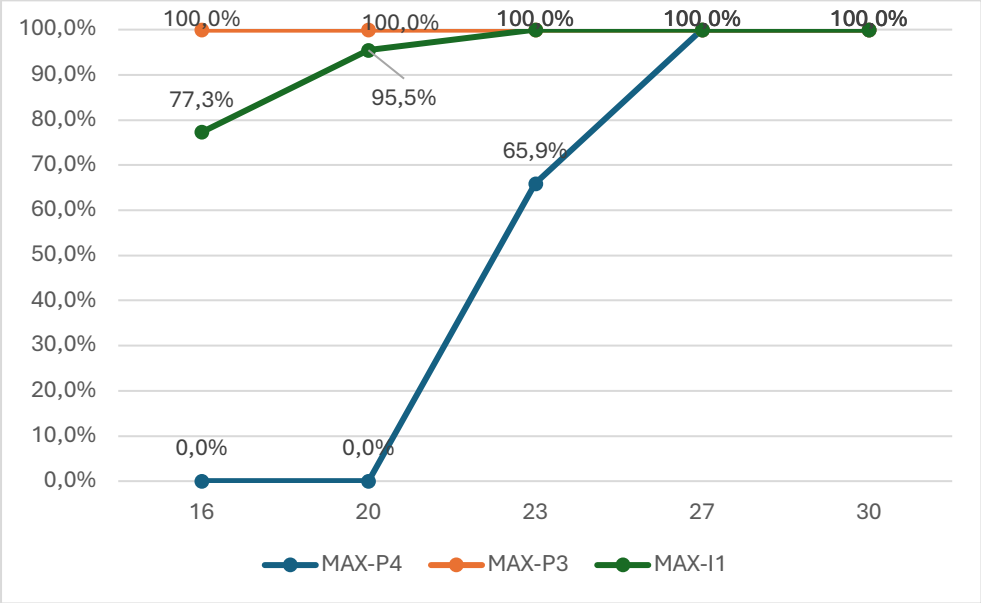


Grafico 2 – Percentuali cumulate di eruzione dentale a livello mascellare

	ERUZIONE DENTALE					
CATEGORIA	**i^1 MAX**	**± IC95%**	**p_3 MAND**	**± IC95%**	**p^4 MAX**	**± IC95%**
SUINETTO SOTTOSCROFA < 21 gg	39%	29-49%	18%	10-26%	0%	-
SUINETTO SOTTOSCROFA 21-28 gg	100%*	-	100%*	-	81%*	73-89%
SUINETTO SVEZZATO (> 28 gg fino a 10 sett.)	100%*	-	100%*	-	100%*	-
SUINI ALL'INGRASSO (da 10 sett. - alla macellazione)	100%*	-	100%*	-	100%*	-

Tabella 3 – Prevalenza dell'eruzione dentale dei denti nelle diverse categorie con relativa significatività statistica - i^1 MAX= incisivo 1 mascellare; p_3 MAND= premolare 3 mandibolare; p^4 MAX= premolare 4 mascellare - IC= intervallo di confidenza; *= $p<0,05$ (I^1 <21g vs ≥21-28g; p_3 <21g vs ≥21-28g; p^4 <21g vs 21-28g e 21-28g vs > 28g)

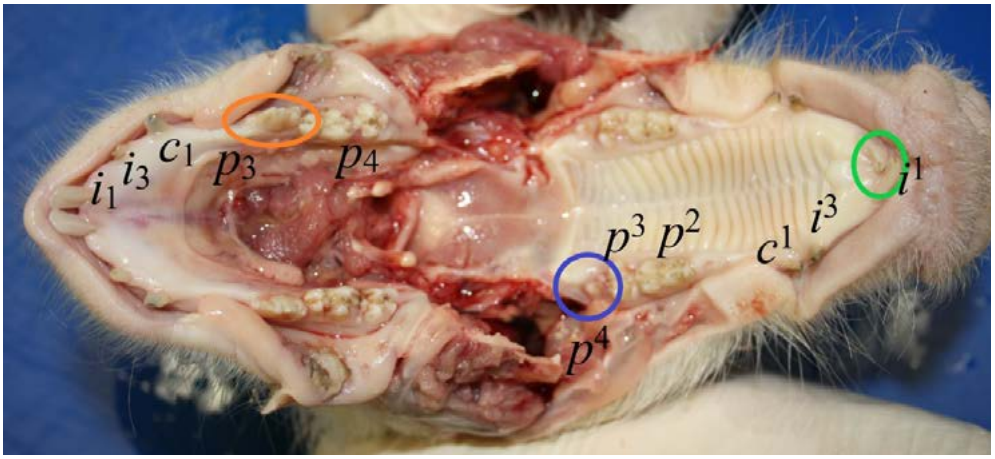


Immagine 1 – Arcata dentale decidua di un suinetto di 28 gg di vita. In particolare a livello mascellare è possibile riconoscere p^4 (cerchiato in blu), p^3, c^1, i^3, i^1 (cerchiato in verde); mentre a livello mandibolare p_4, p_3 (cerchiato in arancio), c_1, i_3 e i_1.

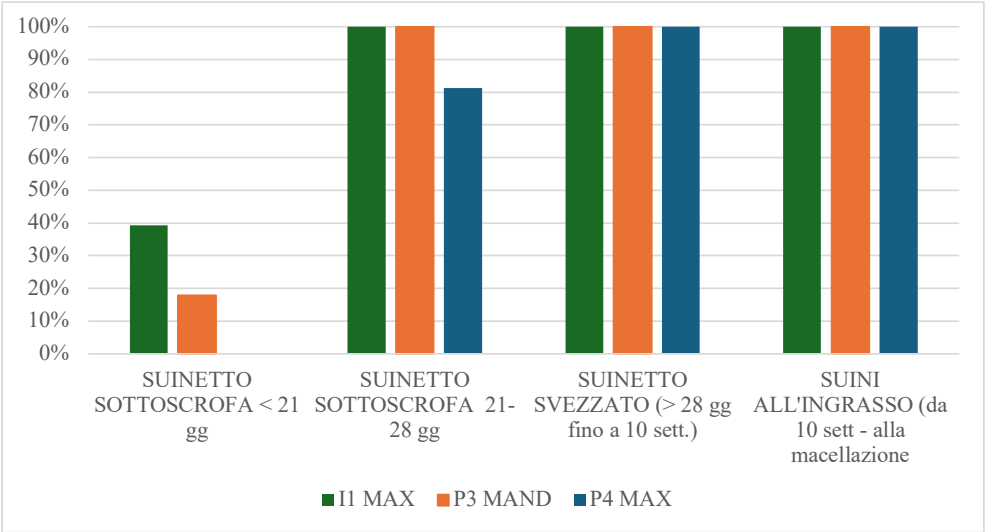


Grafico 3 – Distribuzione della prevalenza dell'eruzione dei denti nelle diverse categorie – i^1 MAX= incisivo 1 mascellare (I1); p_3 MAND= premolare 3 mandibolare (P3); p^4 MAX= premolare 4 mascellare (P4)

DISCUSSIONE

Studio longitudinale

Dalle analisi statistiche solo il confronto tra i giorni di rilievo ha evidenziato per alcuni denti una differenza significativa $p<0,05$ (max-p^4 20g vs 23g e 23g vs 27g; MAX-i^1 16g vs 20g; MAN-p_3 16g vs 20g e 20g vs 23g) in linea con un altro studio internazionale (Tucker e Widoski, 2009); tuttavia in questo lavoro nessuna delle altre variabili studiate ha mostrato

delle differenze significative (p>0,05) contrariamente ad altri studi (Tucker et al., 2010; Tucker e Widoski, 2010). Prendendo in esame le date stabilite dalla normativa ed il fattore correttivo utilizzato per determinare la data di eruzione dentale (Tucker et al., 2009): mediamente a 21gg i suinetti presentano a livello mascellare p^4(65,9%), mentre p^3, c^1, i^3, e i^1 tutti al 100%. A livello mandibolare p_3 (97,7%), mentre p_4, c_1, i_3 e i_1 tutti al 100%. Queste prime considerazioni portano a designare i^1 mascellare e p_3 mandibolare come possibili discriminanti a 21 giorni, data l'eruzione in tutti i soggetti tra i 20 e 23gg di vita. Per quanto concerne invece l'età di svezzamento a 28gg tutti i suini avevano sia a livello mascellare che mandibolare p^4, p^3, c^1, i^3, i^1, p_4, p_3, c_1, i_3 e i_1. p^4 mascellare in questo caso sembra essere un buon discriminante dato che mediamente l'eruzione in tutti i soggetti avviene a circa 25gg, con presenza completa ben evidente a circa 28gg.

Studio trasversale

Nei suinetti sottoscrofa < 21 giorni p^4 mascellare (p^4 MAX) risulta assente in tutti i 28 animali, mentre i^1 mascellare (i^1 MAX) e p_3 mandibolare (p_3 MAND) hanno una prevalenza rispettivamente di 39% e 18%. Per quanto riguarda invece i suinetti sottoscrofa tra i 21 e 28 giorni di vita l'eruzione di i^1 MAX e p_3 MAND è presente nel 100% dei casi (16), per p^4 MAX invece la presenza è riscontrata nel 81%. Per gli animali appartenenti alle categorie dei suinetti svezzati e dei suini all'ingrasso, la presenza dei denti esaminati è accertata nel 100% dei casi. Questi dati corroborano le osservazioni condotte nello studio longitudinale.

Considerazioni generali

I risultati acquisiti in queste due fasi di studio preliminari e di fattibilità, mostrano interessanti ed incoraggianti prospettive riguardanti l'indicazione di parametri oggettivi circa la valutazione dell'età di svezzamento del suinetto, tramite la valutazione della tavola dentaria.

Lo svezzamento, inteso come distacco dalla madre, nonché la formazione di nuovi gruppi tra gli animali, è una fase critica per il suinetto, che deve essere fisiologicamente pronto al drastico cambio alimentare. Tanti accorgimenti sono stati introdotti nelle pratiche gestionali nell'allevamento intensivo per supportare questa fase. Tuttavia, è lo sviluppo fisiologico ad indicare che l'animale è pronto per affrontare questo passaggio (Wensley et al., 2021). Seppur preliminari, i risultati ottenuti indicano che a 21gg di vita, età prevista per lo svezzamento precoce esclusivamente in siti specializzati, sembra non esserci una completa preparazione dentale. Infatti, dei suinetti sottoscrofa al di sotto dei 21 giorni solo il 39% (11 su 28) presentano la completa eruzione dell'i^1 max, e solo il 18% (5 su 28) il p_3 mand; mentre per il p^4 max in nessun animale si è riscontrata la presenza. Questa parziale eruzione dentale incide con possibili ripercussioni negative sulla facilità di alimentazione ed il relativo cambio di dieta (Wensley et al., 2021). Dall'altro lato i risultati esprimono che a 28gg la dentizione è completa, con l'eruzione di tutti i denti esaminati, supportando quindi tale limite temporale imposto per legge per lo svezzamento ordinario dei suinetti.

CONCLUSIONI

Sebbene la numerosità campionaria debba essere estesa ad un numero maggiore di animali ed integrata ampliando la casistica e le variabili analizzate (genetica, numero di parto, sesso, peso) per verificare i possibili effetti sull'eruzione dentale. Questo primi risultati a livello europeo pongono ottime prospettive per la definizione di cut-off validi ed utili a valutare obiettivamente l'età dei suinetti allo svezzamento fornendo un parametro oggettivo di controllo, fondamentale per la tutela del benessere animale nonché per la verifica del rispetto dei requisiti della normativa comunitaria.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, M. E., González-Montaña, J. R., & Lomillos, J. M. (2020). Consumers' concerns and perceptions of farm animal welfare. Animals, 10(3), 385.
2. Campbell, J.M., Crenshaw, J.D. & Polo, J. The biological stress of early weaned piglets. J Animal Sci Biotechnol 4, 19 (2013).
3. Garn, S. M., Lewis, A. B., & Kerewsky, R. S. (1965). Genetic, nutritional, and maturational correlates of dental development. Journal of dental research, 44(1), 228-242.
4. Tonge, C. H., McCance, R. A. (1973). Normal development of the jaws and teeth in pigs, and the delay and malocclusion produced by calorie deficiencies. Journal of anatomy, 115(Pt 1): 1–22
5. Tucker AL, Widowski TM (2009). Normal profiles for deciduous dental eruption in domestic piglets: effect of sow, litter, and piglet characteristics. J Anim Sci 87(7):2274-81.
6. Tucker AL, Duncan IJ, Millman ST, Friendship RM, Widowski TM (2010). The effect of dentition on feeding development in piglets and on their growth and behavior after weaning. J Anim Sci. 88(7):2277-88.
7. Wensley MR, Tokach MD, Woodworth JC, Goodband RD, Gebhardt JT, DeRouchey JM, McKilligan D (2021). Maintaining continuity of nutrient intake after weaning. II. Review of post-weaning strategies. Transl Anim Sci 5(1):1-16.
8. DIRETTIVA 2008/120/CE DEL CONSIGLIO del 18 dicembre 2008 che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini.

LA GESTIONE DELLE SCROFE GRAVIDE ALL'IMBRANCAMENTO: IMPLICAZIONI PER IL BENESSERE ANIMALE E LE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE

GROUP MANAGEMENT OF PREGNANT SOWS AT MIXING: IMPLICATIONS FOR ANIMAL WELFARE AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE

GALLI M.C.

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova

Parole chiave: scrofe, gestazione, benessere animale
Keywords: sows, gestation, animal welfare

Riassunto
Negli allevamenti convenzionali le scrofe gravide sono esposte a rilevanti conseguenze in termini di benessere, associate al confinamento in gabbia, all'aggressività necessaria per stabilire la gerarchia sociale e all'incapacità di eseguire comportamenti esplorativi. Il primo passo di questa tesi è stato quello di condurre una revisione sistematica volta a valutare come la comunità scientifica ha affrontato il tema del benessere delle scrofe gravide negli ultimi 30 anni. Sebbene il numero di pubblicazioni sulla gestione delle scrofe in gruppo e sugli arricchimenti ambientali sia aumentato negli ultimi 10 anni, il loro limitato numero suggerisce la necessità di ulteriori indagini. Un secondo passo è stato quello di valutare gli effetti della riduzione del tempo trascorso dalle scrofe nelle gabbie gestazione. I risultati dei primi due studi di campo suggeriscono che le scrofe possono essere imbrancate subito dopo l'inseminazione anziché 28 giorni dopo, senza influenzare negativamente gli indicatori di benessere, le prestazioni riproduttive, le dimensioni della nidiata e lo spessore del grasso dorsale. Un ulteriore studio di campo ha valutato l'effetto della fornitura di paglia e di corde di fibra sul comportamento aggressivo. I risultati hanno indicato una diminuzione complessiva dell'aggressività, sebbene l'effetto sia stato ridotto nel giorno dell'imbrancamento. In conclusione, questi studi potrebbero fornire dati utili per capire come rispondere al meglio alla richiesta dei cittadini di porre fine all' "Era delle Gabbie".

Abstract
In conventional farming pregnant sows experience highly relevant welfare consequences associated with confinement in stall, aggression required to establish the social hierarchy and inability to perform exploratory behaviour. The first step of this thesis was to conduct a systematic review aimed at assessing how the scientific community addressed the subject of pregnant sow welfare over the past 30 years. Although the number of publications on group management and environmental enrichments increased over the last 10 years, their limited number suggests the need for further investigations. A second step was to evaluate the effects of reducing the time pregnant sows spend in gestation stalls. The results of the first two field study suggest that sows can be mixed early after insemination rather than 28 days after, without negatively affecting welfare indicators, reproductive performance, litter size or back fat thickness. A further field study evaluated the effect of providing access to straw in racks and ropes on aggressive behaviour. The results indicate an overall decrease in aggression, although the effect was reduced on the day of mixing. In conclusion, the implications of these studies are that they indicate the possibility to reduce the time pregnant sows spend

in gestation stalls and they could provide further useful data on how best to respond to the citizens' request to put an end to the "Cage Age".

INTRODUZIONE

Negli allevamenti intensivi convenzionali le scrofe sono esposte a diverse conseguenze molto rilevanti in termini di benessere. Per quanto riguarda le scrofe gravide, le conseguenze sul benessere sono principalmente associate al confinamento nelle gabbie individuali, allo stress sociale legato all'aggressività necessaria per stabilire la gerarchia durante l'imbrancamento e all'incapacità di mettere in atto comportamenti esplorativi e di foraggiamento. Le implicazioni per il benessere e la salute delle scrofe dovute alla stabulazione individuale nelle gabbie gestazione si riferiscono principalmente alla ridotta capacità dell'animale di muoversi e socializzare (Efsa, 2007; Efsa Ahaw Panel, 2022). Per quanto riguarda lo stress sociale, in condizioni naturali tra i membri di un gruppo di suini il comportamento aggressivo è assente o raro grazie ad una gerarchia sociale lineare semplice e stabile. Tuttavia, negli allevamenti commerciali le scrofe vengono unite in gruppi con altre scrofe sconosciute almeno una volta per ogni gestazione, determinando ogni volta la necessità di dover formare la gerarchia di dominanza, la quale prevede un alto livello di aggressività (Verdon e Rault, 2018). I combattimenti per stabilire l'ordine gerarchico possono essere intensi, ma generalmente non durano più di 1 – 2 giorni dopo l'imbrancamento (Arey e Edwards, 1998). Per quanto riguarda l'incapacità di mettere in atto comportamenti esplorativi e di foraggiamento, l'assenza di materiali adeguati a cui indirizzare questo comportamento all'interno degli allevamenti commerciali provoca frustrazione e/o noia, e determina lo sviluppo di comportamenti anomali, quali aggressività, stereotipie e irrequietezza (Whittaker et al., 1998). Le conseguenze sul benessere delle scrofe gravide derivanti dalla mancanza di un substrato adatto per l'esplorazione sono considerate di grande rilevanza poiché durante la gestazione le scrofe vengono alimentate in modo razionato con una dieta concentrata che viene consumata in breve tempo. Questo tipo di alimentazione, pur potendo soddisfare gli animali da un punto di vista energetico, lascia le scrofe insoddisfatte da un punto di vista comportamentale (D'Eath et al., 2009; Lawrence e Terlouw, 1993).

Attualmente, secondo la direttiva europea, le scrofe e le scrofette possono essere stabulate nelle gabbie gestazione per quattro settimane dopo la fecondazione (2008/120/CE). Il motivo principale alla base della decisione di tenere le scrofe nelle gabbie individuali durante questo periodo è legato al fatto che il comitato scientifico del 1997 (Commissione europea, 1997) identificò la fase dell'impianto embrionale come un periodo critico del ciclo della scrofa. Questa fase nei suini inizia circa 11-13 giorni dopo l'inseminazione e si completa intorno ai 17-25 giorni di gravidanza (Dantzer and Winther, 2001; Spoolder et al., 2009). Durante gli studi intrapresi in quegli anni emerse che lo stress durante questo periodo poteva potenzialmente portare a mortalità embrionale e quindi ridurre la portata al parto e le dimensioni della nidiata (Salak-Johnson, 2017; Spoolder et al., 2009). Tuttavia, considerando che la direttiva ora in vigore (2008/120/CE) non ha apportato alcuna modifica a quanto precedentemente disciplinato dalla 2001/88/CE, possiamo affermare che la legislazione europea riguardante le scrofe gravide non è cambiata negli ultimi 20 anni. Una nuova svolta sembra però molto imminente. Infatti, nel giugno 2021, la Commissione europea ha annunciato che sarà presentata una nuova proposta legislativa con l'obiettivo di eliminare gradualmente e vietare definitivamente l'uso delle gabbie a partire dal 2027 per tutte le specie e le categorie oggetto dell'iniziativa, comprese le scrofe gravide.

Alla luce di queste evidenze, l'obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quello di: valutare come la comunità scientifica ha affrontato il tema del benessere delle scrofe gravide, come è cambiato negli ultimi 30 anni e quali sono stati i fattori che hanno determinato questo cambiamento; valutare gli effetti della riduzione del tempo che le scrofe gravide trascorrono

nelle gabbie gestazione sulle misure di benessere e sulla performance riproduttive e infine studiare dei metodi che possano ridurre lo stress e le aggressioni derivanti dal mescolamento di gruppi di scrofe sconosciute.

MATERIALI E METODI

Review**.** La ricerca bibliografica è stata condotta nel database Scopus, utilizzando una stringa progettata per ottenere tutti gli articoli pubblicati negli ultimi 30 anni che fornissero dati sul benessere della scrofa (o della scrofetta) in gestazione:

TITLE-ABS-KEY (((sow OR gilt) AND (gestati* OR pregnan*) AND (welfare OR well-being))) AND DOCTYPE (ar) AND PUBYEAR > 1989 AND PUBYEAR < 2020

Tutti gli articoli raccolti dalla ricerca online sono stati scansionati per eliminare quelli che erano stati inclusi a causa di parole chiave diverse da quelle fornite dall'autore. Successivamente, sono stati rimossi i duplicati dall'elenco di riferimento. I titoli e gli abstract rimanenti sono stati valutati per la loro rilevanza utilizzando le seguenti domande:

1. Il titolo e/o l'abstract sono disponibili in inglese?".
2. Il titolo e/o l'abstract valutano un intervento sulla gestazione di scrofe e/o scrofette?".
3. Il titolo e/o l'abstract descrivono un risultato rilevante per il benessere?".
4. Il titolo e/o l'abstract descrivono uno studio analitico di ricerca primaria?".

Il testo completo deli articoli ritenuti idonei dalla precedente fase di screening sono stati valutati utilizzando le stesse quattro domande e gli stessi criteri di idoneità. Per tutti gli studi inclusi dopo lo screening del testo completo sono state estratte le seguenti caratteristiche: anno di pubblicazione, Paese del primo autore, titolo della rivista, numero di citazioni, popolazione dello studio (scrofa, scrofetta o entrambe) e criteri di inclusione (interventi ed indicatori).

Gli interventi impiegati nel periodo di gestazione sono stati classificati in:

- Interventi strutturali
- Interventi sulla gestione dei gruppi
- Interventi nutrizionali
- Fornitura di arricchimenti ambientali

Gli indicatori di benessere utilizzati ammissibili per l'inclusione nella revisione sono stati :

- Indicatori comportamentali
- Indicatori fisici
- Indicatori fisiologici
- Indicatori riproduttivi
- Indicatori di crescita/produttività

Trial 1 e Trial 2**.** Il primo studio è stata condotto in un allevamento commerciale a ciclo chiuso di 600 scrofe situato in provincia di Brescia, mentre il secondo studio è stato condotto in un allevamento commerciale a ciclo chiuso di 2000 scrofe situato a Co. Cork, Irlanda.

In entrambe le prove le scrofe sono state svezzate 4 settimane dopo il parto e sono state quindi stabulate nelle gabbie individuali. Una volta fecondate, le scrofe della bande oggetto di studio sono state assegnate, in base all'ordine di parto e allo spessore del lardo dorsale, a uno dei seguenti trattamenti sperimentali:

- Gruppo sperimentale: le scrofe sono state imbrancate in gruppi statici 4 (Trial 1,PEN4D) o 2 (Trial 2, PEN2D) giorni dopo la fecondazione.
- Gruppo controllo (PEN28D): le scrofe sono rimaste nelle gabbie individuali fino a 28 giorni dopo la fecondazione e sono state poi imbrancate in gruppo statici.

Tutte le scrofe sono state mantenute nel loro gruppo di trattamento fino a 110 giorni di gestazione, quando sono state poi trasferite nelle gabbie parto.
Nel Trial 1 le scrofe sono state stabulate in gruppi di 21, con pavimento pieno in cemento. Il mangime è stato distribuito manualmente, distribuendolo in un'ampia area pulita del pavimento del box. Nel Trial 2 le scrofe sono state stabulate in gruppi di 12, con poste di alimentazione individuali a tutta lunghezza e pavimento fessurato.
Come indicatori dell'efficienza riproduttiva sono stati registrati: fertilità ecografica, portata al parto e dimensioni della nidiata (nati totali, nati vivi, nati morti e mummificati). Come indicatore fisco è stato valutato invece il numero di graffi presenti sul corpo degli animali. Nel Trial 1 è stata inoltre valutata la concentrazione di cortisolo salivare e la variazione del lardo dorsale durante la gravidanza. Nel Trial 2, invece, il benessere delle scrofe è stato valutato anche attraverso le osservazioni dei comportamenti aggressivi e la capacità locomotoria.
I dati relativi al conteggio sono stati esaminati utilizzando il test Chi-Square a due proporzioni, i dati normalmente distribuiti sono stati analizzati utilizzando l'Anova, mentre i dati non normalmente distribuiti sono stati elaborati utilizzando il Man-Whitney Test e la Glimmix.

Trial 3. Lo studio è stato condotto nella stessa azienda della seconda prova, un allevamento commerciale da 2000 scrofe a Co. Cork, Irlanda. Al 28° giorno di gravidanze le scrofe dello studio sono state mescolate in uno dei due trattamenti sperimentali:

- Box CONTROLLO: 20 scrofe per banda sono state trasferite in un box di gruppo con pavimento fessurato e poste singole di alimentazione. In cui erano presenti come arricchimenti due blocchi di legno appesi a delle catene e due catene.
- Box MIGLIORATI: Un totale di 20 scrofe per replica sono state trasferite in box simili, ma in cui il pavimento all'interno delle poste di alimentazione era coperto da tappeti di gomma. Inoltre, all'interno di ogni posta di alimentazione erano sospese delle corde di fibra naturale. Al centro dell'area comune, erano presenti due blocchi di legno su catene e due catene semplici e una rastrelliera a torre per la paglia. Inoltre, due rastrelliere erano montate sui cancelli del box.

I comportamenti aggressivi sono stati monitorati subito dopo (T0), 24 ore (T1) e 3 settimane (T21) dopo l'imbrancamento. Durante i giorni di osservazione, tutti i comportamenti aggressivi e l'identità delle scrofe coinvolte negli incontri sono stati registrati per 2 ore consecutive.
Nessuna delle variabili registrate nello studio era normalmente distribuita, pertanto per l'elaborazione dei dati è stata utilizzata la procedura Genmod.

RISULTATI

Review. La ricerca bibliografica ha identificato 318 articoli. Di queste pubblicazioni, 102 sono state ritenute rilevanti dopo il processo di screening, ammissibilità e inclusione. A livello globale, negli ultimi 30 anni il numero di articoli sul benessere delle scrofe in gestazione è aumentato, ad eccezione del periodo 2000-2004 in cui si è registrata una leggera riduzione. Dal 1990 al 2014, l'Europa e il Nord America sono stati sostanzialmente gli unici due continenti che hanno pubblicato articoli sul benessere della scrofa in gestazione. Negli ultimi cinque anni invece anche Oceania, America Latina e Asia hanno iniziato a pubblicare articoli su questo argomento. Fino al 2014, gli interventi strutturali sono stati l'argomento più studiato, seguito dall'alimentazione, ma negli ultimi cinque anni la tendenza è cambiata e sono aumentate le pubblicazioni sulla gestione dei gruppi e, in misura minore, sugli arricchimenti ambientali. Per quanto riguarda gli indicatori di benessere, fino al 2009 il comportamento era quello più utilizzato, ma negli ultimi 10 anni tutti gli altri indicatori di benessere sono stati impiegati con una frequenza simile, e negli ultimi cinque anni le performance riproduttive e gli indicatori fisici sono stati utilizzati più spesso di tutti gli altri. Ciò riflette la crescente multidisciplinarità nella valutazione del benessere, ma è

anche probabilmente dovuto all'aumento del numero di studi sulla gestione dei gruppi. Questo è infatti l'unico intervento in cui il benessere delle scrofe è stato valutato più frequentemente attraverso indicatori fisici e prestazioni riproduttive.

Trial 1 e Trial 2. I risultati di entrambi gli studi evidenziano che il trattamento sperimentale non ha avuto effetti significativi sugli indicatori di efficienza riproduttiva, sulla dimensione delle nidiate, né sul numero di lesioni fresche. Tuttavia è importante sottolineare che nel Trial 2 è stata registrata una tendenza (P= 0,06) per le scrofe imbrancate 2 giorni dopo la fecondazione a registrare una minore fertilità ecografica. Per quanto riguarda gli altri indicatori di benessere, nel Trial 1 non è stato trovato alcun effetto significativo del trattamento sullo spesso del lardo dorsale, né sulla concentrazione di cortisolo salivare; nel Trial 2 l'effetto del trattamento è stato osservato solo sul numero di combattimenti registrati il giorno dopo l'imbrancamento, maggiore nel PEN2D, ma non sono stati influenzati né il numero di lesioni cutanee né la locomozione.

Tabella 1. Trial 1: effetto dello stadio di gestazione al momento dell'imbrancamento (PEN4D=4 giorni dopo la fecondazione e PEN28D=28 giorni dopo la fecondazione) sulle delle prestazioni riproduttive e sulla dimensioni della nidiata.
Table 1. Trial 1: effect of stage of gestation at mixing (PEN4D=4 days after service and PEN28D=28 days after service) on measurements reproductive performance and litter size.

Misurazioni:	PEN4D	PEN28D	P Value
Fertilità ecografica (%)	88 (183/209)	85 (146/171)	0.64
Portata al parto (%)	84 (175/209)	81 (138/171)	0.52
Nati totali (n.)	14.4 ± 0.29	14.3 ± 0.31	0.81
Nati vivi (n.)	13.0 ± 0.26	12.8 ± 0.27	0.80
Nati morti (%)	8 (0-13)	7 (0-14)	0.76
Mummificati (%)	0 (0-0)	0 (0-6)	0.17

Tabella 2. Trial 2: effetto dello stadio di gestazione al momento dell'imbrancamento (PEN2D=2 giorni dopo la fecondazione e PEN28D=28 giorni dopo la fecondazione) sulle delle prestazioni riproduttive e sulla dimensioni della nidiata
Table 2. Trial 2: effect of stage of gestation at mixing (PEN2D=2 days after service and PEN28D=28 days after service) on measurements reproductive performance and litter size.

Misurazioni:	PEN2D	PEN28D	P Value
Fertilità ecografica (%)	83 (60/72)	94 (68/72)	0.06
Portata al parto (%)	80 (58/72)	88 (64/72)	0.25
Nati totali (n.)	15.3 ± 0.51	15.6 ± 0.48	0.67
Nati vivi (n.)	14.2 ± 0.42	14.4 ± 0.40	0.75
Nati morti (%)	5 (0-11)	7 (0-12)	0.07
Mummificati (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.37

Trial 3. Complessivamente, le scrofe dei box CONTROLLO hanno messo in atto un maggior numero di comportamenti di lotta rispetto alle scrofe nei box MIGLIORATI ($P < 0,001$). Tuttavia, entro il tempo questa differenza era significativa solo a T21 ($P < 0,001$). Inoltre, le scrofe dei box CONTROLLO hanno complessivamente messo in atto più comportamenti aggressivi rispetto alle scrofe dei box MIGLIORATI ($P= 0,02$)

DISCUSSIONE

Review. Dai risultati della revisione sistematica sembrerebbe che, per quanto riguarda la legislazione europea in materia di benessere delle scrofe gestanti, la ricerca scientifica sia di supporto non tanto per l'emanazione delle norme, quanto per una loro corretta e migliore applicazione. Infatti, è dal 2011 che l'Unione Europea ha introdotto l'obbligo di stabulare le scrofe in gruppo e di fornire loro materiali manipolabili, tuttavia sembra che i ricercatori si siano interessati a questi temi solo in una fase successiva, a partire principalmente dall'intervallo degli anni 2010-2014, quando le disposizioni erano diventate obbligatore per tutti gli allevamenti. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la legislazione europea fornisce solo poche istruzioni e vincoli precisi su come applicare queste direttive.

Trial 1 e Trial 2. I risultati dei primi due studi di campo suggeriscono che è possibile ridurre il tempo in cui le scrofe sono confinate dal punto di vista motorio e sociale nelle gabbie gestazione senza che ciò influisca negativamente sul loro benessere e sulle dimensioni della nidiata, raggruppandole subito dopo la fecondazione (2-4 giorni post-inseminazione) in box di gruppo con alimentazione a terra o con poste di alimentazione individuale. Per quanto riguarda l'effetto che il raggruppamento precoce potrebbe avere sulle prestazioni riproduttive, i risultati mostrano che, nei box con sistemi di alimentazione a terra, la fertilità ecografica e la portata al parto non sono stati influenzati dal momento della gestazione al momento dell'imbrancamento, mentre nei box con le poste di alimentazione individuale è stata riscontrata una tendenza inferiore di questi parametri nelle scrofe imbrancata precocemente dopo l'inseminazione. Per comprendere questa tendenza è importante analizzare i risultati delle lesioni cutanee. Infatti, sebbene nel Trial 2 il numero medio di lesioni cutanee fresche non differisse in nessun momento tra i due trattamenti, e il numero di lesioni fresche diminuisse bruscamente dal primo all'ottavo giorno dopo l'imbrancamento in entrambi i trattamenti, è interessante notare che il numero di lesioni fresche 8 giorni dopo l'imbrancamento appare piuttosto elevato in entrambi i trattamenti. Questo potrebbe essere un'evidenza del fatto che il libero accesso alle poste di alimentazione individuale potrebbe portare a un'aggressione prolungata tra le scrofe per l'instaurazione della gerarchia sociale. Infatti, nei box con le poste di alimentazione, le scrofe sono state osservate al loro interno per quasi tutto il tempo e questo presumibilmente potrebbe portare ad un prolungamento degli scontri nel tempo. Sebbene nel trattamento PEN28D questo prolungamento non abbia portato a problemi nel mantenimento della gravidanza, in quanto l'impianto embrionale era completato, nel trattamento PEN2D significherebbe che le aggressioni sono continuate fino al periodo critico dell'impianto dell'embrione, causando probabilmente problemi nel mantenimento della gravidanza.

Trial 3. Per ridurre gli effetti dannosi del comportamento aggressivo, arricchimenti ambientali ottimali, come la paglia e le corde naturali, sembrano avere un effetto ridotto il giorno dell'imbrancamento, quando le scrofe devono stabilire la gerarchia di dominanza. Infatti, data l'importanza evolutiva della gerarchia di dominanza per mantenere la stabilità del gruppo, non sorprende che essa abbia la precedenza su altre attività di minor valore, come, in questo caso, interagire con i materiali di arricchimento o mangiare la paglia. Tuttavia, è

importante notare che 21 giorni dopo l'imbrancamento si sono verificate più lotte nei box CONTROLLO rispetto a quelli MIGLIORATI. Ciò indica che l'arricchimento ambientale ha un ruolo importante in un secondo momento, quando si è stabilita la gerarchia sociale.

CONCLUSIONI

I risultati della revisione sistematica hanno rivelato che la ricerca scientifica sul benessere delle scrofe in gestazione richiede maggiore attenzione, in particolare su argomenti come il momento di imbrancamento in gruppi dopo la fecondazione e la fornitura di arricchimenti ambientali, che sono argomenti meno studiati ma particolarmente importanti alla luce dell'attuale revisione della legislazione europea sul benessere degli animali.

I risultati del Trial 1 e Trial 2 suggeriscono che è possibile ridurre il tempo in cui le scrofe sono confinate dal punto di vista motorio e sociale nelle gabbie gestazione senza influire negativamente sul loro benessere e sulle dimensioni della nidiata, raggruppandole immediatamente dopo la fecondazione in sistemi di gruppo con alimentazione a terra o con poste di alimentazione individuale. Per quanto riguarda l'effetto che il raggruppamento precoce potrebbe avere sulle prestazioni riproduttive, i risultati mostrano che i diversi sistemi di stabulazione portano a differenze nella durata della formazione della gerarchia, e questo potrebbe avere effetti diversi sulle prestazioni riproduttive delle scrofe mescolate precocemente.

Per ridurre gli effetti dannosi del comportamento aggressivo, i risultati del Trial 3 suggeriscono che arricchimenti ambientali attrattivi, come la paglia e le corde in fibra naturali, sembrano avere un effetto ridotto il giorno dell'imbrancamento , quando le scrofe devono ancora stabilire la gerarchia di dominanza, ma sembrano essere utili per ridurre la frequenza complessiva delle aggressioni nei giorni successivi.

BIBLIOGRAFIA

1. Arey, D.S., Edwards, S.A. (1998) Factors influencing aggression between sows after mixing and the consequences for welfare and production. Livest. Prod. Sci. 56, 61–70.
2. Commissione europea (1997). Reports of the Scientific Veterinary Committee (Animal Health and Animal Welfare Sections): The Welfare of Intensively Kept Pigs.
3. D'Eath, R.B., Turner, S.P. (2009) The Natural Behaviour of the Pig, in: The Welfare of Pigs (Ed. JN Marchant-Forde). pp. 13–45.
4. EFSA AHAW Panel (2022) Welfare of pigs on farm. EFSA J. 20.
5. EFSA (2007) Animal health and welfare aspects of different housing and husbandry systems for adult breeding boars, pregnant, farrowing sows and unweaned piglets - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. EFSA J. 5, 1–13.
6. Lawrence, A.B., Terlouw, E.M.C. (1993) A Review of Behavioral Factors Involved in the Development and Continued Performance of Stereotypic Behaviors in Pigs. J. Anim. Sci. 71, 2815–2825.
7. Spoolder, H.A.M., Geudeke, M.J., Van der Peet-Schwering, C.M.C., Soede, N.M. (2009) Group housing of sows in early pregnancy: A review of success and risk factors. Livest. Sci. 125, 1–14.
8. Verdon, M., Rault, J. (2018) Aggression in group housed sows and fattening pigs, in: Advances in Pig Welfare. Elsevier Ltd, pp. 237–262.
9. Whittaker, X., Spoolder, H.A.M., Edwards, S.A. (1998) The influence of dietary fibre and the provision of straw on the development of stereotypic behaviour in food restricted pregnant sows. Appl. Anim. Behav. Sci. 61, 89–102.

POSTER

CONFRONTO TRA OSSIDO DI ZINCO FARMACOLOGICO E UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI COMPOSTI BOTANICI SU PERFORMANCE E TRATTAMENTI MEDICALI IN SUINETTI ALLO SVEZZAMENTO

COMPARISON OF PHARMACOLOGICAL ZINC OXIDE AND A MICROENCAPSULATED MIXTURE OF BOTANICALS ON PERFORMANCE AND MEDICAL TREATMENTS IN WEANED PIGLETS

BONETTI A.[1], TUGNOLI B.[1], PIVA A.[1,2], CORINO C.[3], ROSSI R.[3], GRILLI E.[2,4]

[1] Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124 Reggio Emilia, Italia;
[2] DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italia;
[3] Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università di Milano, Via dell'Università 6, 26900 Lodi, Italia;
[4] Vetagro Inc., 17 E. Monroe St., 60603 Chicago, IL, USA;

Parole chiave: zinco ossido farmacologico, composti botanici, microincapsulazione, suinetti, svezzamento
***Keywords*:** pharmacological zinc oxide, botanicals, microencapsulation, piglets, weaning

Riassunto
Lo studio ha valutato l'effetto di una miscela microincapsulata di composti botanici (BOT) in suinetti allo svezzamento, in confronto all'applicazione di ZnO farmacologico. Un totale di 192 suinetti, svezzati a 28 giorni d'età, sono stati divisi in 4 gruppi: controllo negativo (C-), dieta standard; controllo positivo (C+), dieta standard + ZnO a 2500 ppm per i primi 14 giorni; trattamento 1 (B1), dieta standard + BOT a 1 kg/ton per l'intero studio; trattamento 2 (B2), dieta standard + BOT a 2 kg/ton per l'intero studio. Gli animali sono stati monitorati per 42 giorni, eseguendo un cambio dieta dalla fase prestarter a starter il giorno 14. Dopo il cambio dieta, gli animali del gruppo C+, privati dello ZnO, hanno mostrato una riduzione dei ritmi di crescita tra i giorni 21 e 28, raggiungendo un peso medio finale numericamente inferiore agli altri gruppi. I suini del gruppo B2 hanno invece mantenuto migliori performance rispetto a C+. In seguito alla rimozione dello ZnO, in C+ si sono registrati un aumento della mortalità, del numero di trattamenti farmacologici, e della loro durata, fenomeno rilevato anche nel gruppo C-. Al contrario, BOT ha assicurato una ridotta mortalità e un calo del 50% del numero e della durata dei trattamenti antibiotici e antinfiammatori. In conclusione, BOT può sostenere le performance dei suinetti durante gli stress dello svezzamento, assicurandone un migliore stato di salute.

Abstract
This study aimed at evaluating the effect of a microencapsulated blend of botanicals (BOT) in weaning piglets, in comparison to pharmacological ZnO. A total of 192 piglets, weaned at 28 days of age, were divided in 4 groups: negative control (C-), standard diet; positive control (C+), standard diet + 2500 ppm ZnO for the first 14 days; treatment 1 (B1), standard diet + 1 kg/MT BOT for the entire study; treatment 2 (B2), standard diet + 2 kg/MT BOT for the entire study. Animals were monitored across 42 days, with a change from prestarter to starter diet at day 14. After the shift in the diet, C+ animals, without ZnO, showed a reduced growth between days 21 and 28, reaching a final average body weight

that was numerically lower compared to other experimental groups. Conversely, B2 piglets maintained better performance compared to C+. After ZnO removal, C+ animals registered higher mortality, and higher amount and duration of medical treatments, an effect observed also in C-. On the contrary, BOT guaranteed a reduction in mortality and a 50% decrease in number and duration of antibiotic and anti-inflammatory treatments. In conclusion, BOT can sustain performance parameters of piglets during weaning stress, ensuring an overall improved health status.

INTRODUZIONE

Lo svezzamento rappresenta la fase più delicata del ciclo produttivo del suino, data l'interazione tra diversi fattori dietetici, sociali, gestionali, gastroenterici e immunitari (Zheng et al., 2021). La loro interazione può esacerbare l'insorgenza dello stress, che favorisce sintomatologie quali la diarrea post-svezzamento da ceppi enterotossigenici di *Escherichia coli*, oltre all'insediamento di altri patogeni come lo *Streptococcus suis* (Ferrando & Schultsza, 2016; Luppi, 2017). Per prevenire o attenuare tali problematiche sono state storicamente adoperate dosi farmacologiche di ossido di zinco (ZnO), ma il loro uso è attualmente vietato nell'Unione Europea (Bonetti et al., 2021).

Grazie ai loro molteplici effetti benefici, i composti botanici rappresentano candidati alternativi ideali per gestire lo stress da svezzamento nei suini (Rossi et al., 2020). Precedenti studi hanno dimostrato come una miscela selezionata di composti botanici (BOT) sia in grado di supportare le cellule intestinali durante situazioni di stress, migliorandone lo stato ossidativo e infiammatorio, mantenendone l'integrità e riducendone la suscettibilità ai patogeni (Bonetti et al., 2023).

In tale contesto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'impatto dell'integrazione con BOT in suinetti allo svezzamento provenienti da un allevamento commerciale, ed alimentati senza utilizzo di additivi o promotori della crescita, e confrontarlo con l'approccio tradizionale di applicazione di ZnO farmacologico nel mangime per i primi 14 giorni dopo lo svezzamento.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale. La prova è stata condotta presso il Centro Zootecnico Didattico-Sperimentale dell'Università degli Studi di Milano a Lodi. Tutte le procedure sono state approvate dal Ministero della Salute con autorizzazione n° 198/2023-PR. Centonovantadue suinetti, metà maschi e metà femmine, svezzati a 28 giorni di età e con un peso iniziale medio di 6.7 kg, sono stati identificati individualmente e trasferiti da un allevamento industriale, situato in provincia di Pavia, alle strutture designate per la sperimentazione. Gli animali sono stati disposti al fine di ottenere 48 box composti da 4 suinetti ciascuno, omogenei per peso medio iniziale e sesso. Ogni box era dotato di pavimento grigliato, arricchimenti ambientali (corde di canapa), abbeveratoi e mangiatoia, con acqua e mangime disponibili *ad libitum*. Ogni box è stato successivamente assegnato a uno dei quattro gruppi sperimentali (12 box / gruppo):

- Controllo negativo (C-): dieta basale, ovvero un mangime commerciale standard senza antibiotici o altri additivi alimentari promotori della crescita per l'intera durata della prova;
- Controllo positivo (C+): dieta basale, integrata con 2500 ppm di ossido di zinco (ZnO) limitatamente ai primi 14 giorni dello studio;
- Trattamento 1 (B1): dieta basale, integrata con una miscela microincapsulata di composti botanici (BOT) alla dose di 1 kg/ton per l'intera durata della prova;
- Trattamento 2 (B2): dieta basale, integrata con BOT alla dose di 2 kg/ton per l'intera durata della prova.

La prova sperimentale ha avuto una durata di 42 giorni. La dieta basale (C-) era costituita da mangimi formulati per la copertura dei fabbisogni nutrizionali, come da indicazioni dell'NRC (2012). Al giorno 14, per garantire i fabbisogni nutrizionali dei suinetti, si è eseguito un cambio di dieta dalla fase prestarter a starter.

Rilievi sperimentali. Le condizioni di salute dei suinetti sono state monitorate quotidianamente, procedendo ad eventuali trattamenti in seguito a esame veterinario obiettivo e relative prescrizioni terapeutiche, registrando tutti i dati relativi a medicazioni e mortalità. Il peso dei suinetti (per animale) e il consumo di mangime (per box) sono stati misurati ai giorni 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42. I dati sono stati utilizzati per calcolare (per box) il peso, l'incremento ponderale giornaliero, il consumo medio giornaliero di mangime e l'indice di conversione alimentare su base settimanale.

Analisi statistica. I dati delle performance sono stati analizzati con SPSS 29.0.1.0 mediante test ANCOVA, impostando il peso iniziale (periodo 0-14) o al giorno 14 (periodo 14-42) come covariata e il trattamento come fattore fisso. L'unità sperimentale è il box ($n = 12$) e i valori sono riportati come medie marginali stimate ± errore standard della media (ESM). Le differenze sono state considerate significative con $p \leq 0.05$, e le tendenze con $0.5 < p \leq 0.1$.

RISULTATI

Performance di crescita – fase prestarter (giorni 0-14). La Tabella 1 riporta i risultati delle performance di crescita – tra i giorni 0 e 14 – dei suinetti alimentati *ad libitum* con dieta prestarter, integrata con ZnO o BOT. L'analisi statistica non ha riportato differenze significative per nessuno dei parametri valutati. Analizzando i valori numerici medi, l'integrazione con BOT ha assicurato pesi numericamente più elevati al giorno 7 e al giorno 14 rispetto al C-, soprattutto per la dose di 1 kg/ton.

	Trattamento					
	C-	C+	B1	B2	ESM	P value
Peso, kg						
Giorno 0	6.70	6.70	6.65	6.64	0.04	0.424
Giorno 7	8.27	8.34	8.39	8.33	0.10	0.857
Giorno 14	10.55	10.63	10.63	10.55	0.13	0.953
Accrescimento medio, g/giorno/capo						
Giorni 0-7	226	236	244	235	15	0.857
Giorni 7-14	320	322	317	310	15	0.949
Giorni 0-14	279	272	282	272	10	0.859
Consumo medio, g/giorno/capo						
Giorni 0-7	286	286	305	275	12	0.317
Giorni 7-14	509	484	504	474	12	0.142
Giorni 0-14	400	385	403	378	10	0.215
Indice di conversione						
Giorni 0-7	1.26	1.25	1.18	1.29	0.07	0.638
Giorni 7-14	1.61	1.51	1.64	1.57	0.07	0.593
Giorni 0-14	1.44	1.45	1.44	1.42	0.05	0.978

Tabella 1 - PERFORMANCE DI CRESCITA DEI SUINETTI DURANTE LA FASE PRESTARTER (GIORNI 0-14).
I dati sono presentati come medie marginali stimate (n = 12). C- = dieta standard; C+ = dieta standard + 2500 ppm ZnO; B1 = dieta standard + 1 kg/ton di miscela microincapsulata di composti botanici; B2 = dieta standard + 2 kg/ton di miscela microincapsulata di composti botanici. ESM = errore standard della media.

Table 1 - GROWTH PERFORMANCE OF PIGLETS DURING THE PRESTARTER PHASE (DAYS 0-14).
Data are presented as estimated marginal means (n = 12). C- = standard diet; C+ = standard diet + 2500 ppm ZnO; B1 = standard diet + 1 kg/MT microencapsulated blend of botanicals; B2 = standard diet + 2 kg/MT microencapsulated blend of botanicals. ESM = standard error of the mean.

Performance di crescita – fase starter (giorni 14-42). I risultati delle performance di crescita per la fase starter (giorni 14-42) dei suinetti che hanno assunto diete standard *ad libitum*, anche integrate con BOT, sono riportati nella Tabella 2. I suinetti del gruppo C+ non hanno più ricevuto, dal giorno 14 fino alla fine della prova, ZnO farmacologico. I dati mostrano che, dopo la rimozione dello ZnO, i suinetti del C+ hanno ridotto il loro tasso di crescita, con pesi numericamente inferiori al giorno 21 e 28 rispetto agli altri trattamenti. Pur mostrando un successivo recupero, i suinetti del C+ hanno comunque riportato, a fine prova, 1 kg di peso in meno rispetto a C- e 0.5 kg in meno rispetto a B2. Queste differenze sono state riscontrate anche nell'accrescimento ponderale giornaliero. Tra le due dosi di BOT, l'inclusione a 2 kg/ton ha permesso il mantenimento di performance di crescita numericamente più elevate, come evidenziato nei giorni 21 e 28. Tuttavia, alla fine della prova sperimentale, sono stati i suini C- a registrare il peso corporeo più alto, nonostante durante tutta la prova non siano state rilevate differenze statisticamente significative.

	Trattamento					
	C-	C+	B1	B2	ESM	P value
Peso, kg						
Giorno 14[1]	10.60	10.52	10.51	10.58	0.19	0.986
Giorno 21	13.47	13.33	13.31	13.64	0.15	0.329
Giorno 28	16.70	16.00	16.62	16.81	0.27	0.152
Giorno 35	21.33	20.39	20.89	21.01	0.39	0.406
Giorno 42	27.05	26.14	26.10	26.57	0.59	0.631
Accrescimento medio, g/giorno/capo						
Giorni 14-21	417	398	396	442	22	0.357
Giorni 21-28	471	394	440	448	25	0.187
Giorni 28-35	610	655	606	598	26	0.395
Giorni 35-42	817	749	743	750	33	0.359
Giorni 14-42	571	544	533	552	19	0.556
Consumo medio, g/giorno/capo						
Giorni 14-21	715	716	721	745	23	0.739
Giorni 21-28	921	857	892	909	35	0.614
Giorni 28-35	1088	1119	1093	1075	31	0.785
Giorni 35-42	1277	1215	1241	1243	34	0.653
Giorni 14-42	982	962	979	963	21	0.875
Indice di conversione						
Giorni 14-21	1.73	1.85	1.87	1.76	0.09	0.597
Giorni 21-28	1.96	2.22	2.07	2.05	0.07	0.129
Giorni 28-35	1.81	1.75	1.81	1.81	0.07	0.912
Giorni 35-42	1.59	1.68	1.68	1.69	0.07	0.737
Giorni 14-42	1.72	1.79	1.85	1.76	0.05	0.255

Tabella 2 - PERFORMANCE DI CRESCITA DEI SUINETTI DURANTE LA FASE STARTER (GIORNI 14-42).
I dati sono presentati come medie marginali stimate (n = 12). C- = dieta standard; C+ = dieta standard; B1 = dieta standard + 1 kg/ton di miscela microincapsulata di composti botanici; B2 = dieta standard + 2 kg/ton di miscela microincapsulata di composti botanici. ESM = errore standard della media. [1]I valori di peso medio differiscono da quelli della Tabella 2 in quanto 1 suinetto per box, vicino al peso medio del box stesso, è stato sacrificato per raccogliere campioni per analisi successive, seguendo le procedure autorizzate dal Ministero della Salute.

Table 2 - GROWTH PERFORMANCE OF PIGLETS DURING THE STARTER PHASE (DAYS 14-42).
Data are presented as estimated marginal means (n = 12). C- = standard diet; C+ = standard diet; B1 = standard diet + 1 kg/MT microencapsulated blend of botanicals; B2 = standard diet + 2 kg/MT microencapsulated blend of botanicals. ESM = standard error of the mean. [1]Average body weight values differ from the ones reported in Table 2 because 1 piglet per pen, closer to the average weight of its pen, was sacrificed to collect samples for subsequent future analyses, following procedures approved by the Italian Ministry of Health.

Trattamenti farmacologici. Nella Tabella 3 sono riportati i dati relativi ai trattamenti farmacologici eseguiti durante la sperimentazione, la loro durata, il motivo del trattamento, la durata per tipo di farmaco e la mortalità dei suinetti. Non sono stati registrati decessi nei primi 14 giorni dello studio. Nello stesso periodo, solo 6 suinetti hanno ricevuto trattamenti (4% degli animali). A 5 dei 6 suinetti trattati sono stati somministrati antibiotici per ridurre la diarrea; solo un suino del gruppo B2 è stato trattato anche per sintomi articolari riconducibili a infezione da *S. suis*. Nessun trattamento è stato registrato nei suini del gruppo B1.
Una maggiore incidenza di animali morti e trattati è stata registrata nei giorni 14-42. La mortalità più elevata è stata registrata nel gruppo C+, con 4 animali morti (11.1% degli animali di quel gruppo). Lo stesso gruppo ha registrato il maggior numero di trattamenti (10, pari al 28% dei suinetti di quel gruppo), seguito da C- (8 suini, pari al 22%). Pur segnalando due decessi, nel gruppo B2 sono stati effettuati trattamenti farmacologici solo su 3 animali (8.3% degli animali di quel gruppo). Sette trattamenti su dieci per la diarrea post-svezzamento sono stati registrati nel gruppo C+, mentre quasi il 40% del totale dei trattamenti farmacologici per *S. suis* sono stati effettuati nel gruppo C-. Al contrario, la dose più alta di BOT ha riportato le minori applicazioni di antibiotici e antinfiammatori. Per quanto riguarda la durata, il gruppo C+ ha esibito i numeri più alti (40 giorni cumulativi totali, pari al 4% di tutti i giorni di vita degli animali del gruppo C+), seguito a breve distanza da C- (37 giorni, pari al 3.7%). I giorni totali di trattamento si sono invece attestati a metà o meno della metà per i suinetti rispettivamente dei gruppi B1 e B2.

	Trattamento			
	C-	**C+**	**B1**	**B2**
Giorni 0-14				
Animali trattati[1]	1 (2.1%)	2 (4.2%)	0 (0.0%)	3 (6.3%)
Animali morti[1]	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Numero di trattamenti[2]	1 (16.7%)	2 (33.3%)	0 (0.0%)	3 (50.0%)
Numero trattamenti per diarrea (antibiotici)[2]	1 (20.0%)	2 (40.0%)	0 (0.0%)	2 (40.0%)
Numero trattamenti per *S. suis* (antinfiammatori)[2]	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100%)
Giorni di trattamento[3]	3 (0.4%)	8 (1.2%)	0 (0.0%)	11 (1.6%)
Giorni di trattamento (antibiotici)[3]	3 (0.4%)	8 (1.2%)	0 (0.0%)	9 (1.3%)
Giorni di trattamento (antinfiammatori)[3]	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.3%)
Giorni 14-42				
Animali trattati[1]	8 (22.2%)	10 (27.8%)	5 (13.9%)	3 (8.3%)
Animali morti[1]	1 (2.8%)	4 (11.1%)	1 (2.8%)	2 (5.6%)
Numero di trattamenti[2]	8 (28.6%)	11 (39.2%)	5 (17.9%)	4 (14.3%)
Numero trattamenti per diarrea (antibiotici)[2]	1 (10.0%)	7 (70.0%)	1 (10.0%)	1 (10.0%)
Numero trattamenti per *S. suis* (antinfiammatori)[2]	7 (38.9%)	4 (22.2%)	4 (22.2%)	3 (16.7%)
Giorni di trattamento[3]	37 (3.7%)	40 (4.0%)	20 (2.0%)	15 (1.5%)
Giorni di trattamento (antibiotici)[3]	23 (2.3%)	32 (3.2%)	13 (1.3%)	9 (0.9%)
Giorni di trattamento (antinfiammatori)[3]	14 (1.4%)	8 (0.8%)	7 (0.7%)	6 (0.6%)

Tabella 3 - MORTALITÀ E TRATTAMENTI FARMACOLOGICI NEI DUE PERIODI DELLO STUDIO.
C- = dieta standard; C+ = dieta standard + 2500 ppm ZnO nel periodo 0-14; B1 = dieta standard + 1 kg/ton di miscela microincapsulata di composti botanici; B2 = dieta standard + 2

kg/ton di miscela microincapsulata di composti botanici. ESM = errore standard della media. [1] Le % sono calcolate sulla base del totale degli animali inclusi in ogni gruppo (n = 48, giorni 0-14; n = 36, giorni 14-42). [2] Le % indicano la quantità dei trattamenti rispetto al totale dei trattamenti effettuati in quel dato periodo (giorni 0-14 o 14-42). [3] Le % sono calcolare rispetto al totale dei giorni in vita di tutti i maiali inclusi in un preciso gruppo di trattamento (n = 48, giorni 0-14; n = 36, giorni 14-42).

Table 3 - MORTALITY AND PHARMACOLOGICAL TREATMENTS IN THE TWO STUDY PERIODS.

C- = standard diet; C+ = standard diet + 2500 ppm ZnO in the period 0-14; B1 = standard diet + 1 kg/MT microencapsulated blend of botanicals; B2 = standard diet + 2 kg/MT microencapsulated blend of botanicals. ESM = standard error of the mean. [1] % are calculated based on the total of animals included in that treatment group (n = 48, days 0-14, n = 36, days 14-42). [2] % indicate the ratio of treatments referred to the total treatments performed in that period (days 0-14 or 14-42). [3] % are calculated based on the total days in life of pigs included in a treatment group (n = 48, days 0-14, n = 36, days 14-42).

DISCUSSIONE

L'attuale studio aveva lo scopo di comprendere gli effetti benefici di una miscela microincapsulata di composti botanici (BOT) in suinetti svezzati a 28 giorni di età provenienti da un allevamento commerciale. Nonostante la numerosità non trascurabile, la variabilità è risultata piuttosto elevata e non ha permesso l'osservazione di differenze significative nelle performance di crescita.

Durante i primi 14 giorni, tutti gli animali hanno mostrato una buona crescita, compresi quelli del gruppo C-, probabile indice di una corretta gestione delle fasi preliminari allo svezzamento, riducendo così lo stress e l'insorgenza della diarrea. Considerando i pesi, B1 ha registrato valori numericamente più alti sia al giorno 7 che al giorno 14, probabilmente grazie ad una ingestione di mangime leggermente superiore agli altri gruppi. Al contrario, durante i giorni 0-14, la concentrazione più alta di additivo (B2) non ha sortito lo stesso effetto. Si potrebbe ipotizzare che gli ingredienti di BOT possano possedere, alla dose più alta, un odore intenso, che ha parzialmente limitato l'assunzione di mangime nel primo periodo, un fenomeno tuttavia non evidenziato in precedenti studi. In ogni caso, la tecnologia di microincapsulazione con cui è realizzato BOT, oltre a garantire un lento rilascio dei principi attivi nel tratto intestinale dei suinetti (Piva et al., 2007), può migliorare l'appetibilità e attenuare gli odori sgradevoli.

Con la rimozione dello ZnO farmacologico nella dieta, i suinetti C+ hanno registrato un ridotto accrescimento rispetto agli altri gruppi sperimentali. La loro crescita è stata successivamente ripristinata, ma il ritardo accumulato durante la terza e la quarta settimana ha creato un divario non recuperato nel periodo sperimentale. In effetti, la brusca eliminazione dello ZnO priva improvvisamente gli animali di una molecola che supporta lo stato immunitario, ossidativo e infiammatorio del loro intestino (Bonetti et al., 2021). Inoltre, la riduzione di specie probiotiche come *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* causata dalle dosi elevate di ZnO può avere effetti negativi a lungo termine (Starke et al., 2014). Infine, lo ZnO riduce la virulenza di diversi patogeni (Crane et al., 2011) ma, una volta riportati i suoi livelli a quelli nutrizionali, questa funzione potrebbe andare persa, risvegliando diversi batteri precedentemente sotto controllo. Quest'ultima opzione potrebbe aver riguardato questo studio: mentre durante la fase prestarter non si sono registrati decessi e sono stati eseguiti solo pochi trattamenti, la situazione è cambiata sensibilmente dopo la rimozione dello ZnO. Infatti, i due gruppi di controllo hanno registrato il maggior numero di suinetti morti e trattati. Tali valori sono risultati molto inferiori nei gruppi B1 e B2, che hanno anche visto una notevole riduzione delle durate dei trattamenti. Si potrebbe ipotizzare che la riattivazione dei patogeni intestinali

precedentemente tenuti sotto controllo dallo ZnO possa aver esercitato un'ulteriore pressione biologica sugli animali del C+, ma anche su quelli del C- – accasati nella stessa struttura, seppur in recinti separati – che non avevano alcun integratore nella dieta per aiutare a gestire lo stress. Al contrario, i suinetti integrati con BOT non sarebbero stati influenzati da questi agenti patogeni: la continua assunzione di BOT potrebbe aver favorito la loro la salute e resilienza.

CONCLUSIONI

Nonostante la necessità di approfondire i presenti risultati mediante ulteriori analisi, i dati preliminari offrono sufficienti evidenze per sostenere l'utilizzo di BOT in ulteriori studi di campo. In tale contesto, dove la pressione biologica derivata dall'ambiente risulta più elevata, l'integrazione della dieta con BOT potrebbe esprimere il massimo delle sue potenzialità. Inoltre, la maggiore numerosità raggiungibile in questi scenari potrebbe consentire di ridurre l'alta variabilità riscontrata in questo studio e consolidare i trend positivi evidenziati in presenza di BOT nella dieta.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonetti, A., Toschi, A., Tugnoli, B., Piva, A., Grilli, E. (2023). A blend of selected botanicals maintains intestinal epithelial integrity and reduces susceptibility to Escherichia coli F4 infection by modulating acute and chronic inflammation in vitro. Front. Vet. Sci., 10.
2. Bonetti, A., Tugnoli, B., Piva, A., Grilli, E. (2021). Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets. Animals, 11(3), 1–24.
3. Crane, J. K., Byrd, I. W., Boedeker, E. C. (2011). Virulence inhibition by zinc in Shiga-toxigenic Escherichia coli. Infect. Immun., 79(4), 1696–1705.
4. Ferrando, M. L., Schultsza, C. (2016). A hypothetical model of host-pathogen interaction of Streptococcus suis in the gastro-intestinal tract. Gut Microbes, 7(2), 154–162.
5. Luppi, A. (2017). Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. Porcine Health Manag., 3(16), 1–18.
6. Piva, A., Pizzamiglio, V., Morlacchini, M., Tedeschi, M., Piva, G. (2007). Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. J. Anim. Sci., 85(2), 486–493.
7. Rossi, B., Toschi, A., Piva, A., Grilli, E. (2020). Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. Nutr. Res. Rev., 10, 1–17.
8. Starke, I. C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J., Vahjen, W. (2014). The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. FEMS Microbiol. Ecol., 87(2), 416–427.
9. Zheng, L., Duarte, M. E., Sevarolli Loftus, A., Kim, S. W. (2021). Intestinal Health of Pigs Upon Weaning: Challenges and Nutritional Intervention. Front. Vet. Sci., 8(2), 1–18.

PUNTEGGIATURA DELLE MACCHIE BIANCHE DA *ASCARIS SUUM* MEDIANTE INTELLIGENZA ARTIFICIALE: DATI PRELIMINARI

SCORING WHITE SPOTS BY ASCARIS SUUM *USING ARTIFICIAL INTELLIGENCE: PRELIMINARY DATA*

HATTAB J.,[1] PORRELLO A.,[2] ROSAMILIA A.,[3] ROMANO A.,[4] BERNABO' N.,[5] CAPOBIANCO DONDONA A.,[6] FERRARI L.,[7] SGANZERLA J.,[7] BERNARDI M.,[2] LO PRESTI G.,[8] CORRADI A.,[7] MARRUCHELLA G.[1]

[1]Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Teramo, Loc. Piano d'Accio, 64100; [2]AImageLab, Università di Modena e Reggio Emilia, Via Vivarelli 10/1, 41125 Modena; [3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini" (IZSLER), 25124 Brescia; [4]Associació Porcsa. GSP, Partida La Caparrella 97C, 25192 Lleida, Spagna; [5]Dipartimento di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali, via R. Balzarini 1, 64100, Teramo; [6]Farm4trade s.r.l., Via IV Novembre 33, 66041 Atessa; [7]Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Parma, Via del Taglio 10, 43126 Parma; [8]ATS di Brescia.

Parole chiave: ascaridiosi, punteggiatura, intelligenza artificiale
Keywords: *ascaridiasis, scoring, artificial intelligence*

Riassunto
Le larve di *Ascaris suum* inducono lesioni epatiche (macchie bianche) di comune riscontro nei suini macellati, spesso quantificate per stimare la gravità del problema. Qui si riportano le indagini condotte allo scopo di: a) valutare la distribuzione delle macchie bianche sulla superficie epatica; b) addestrare una rete neurale artificiale, che sia capace di identificare e quantificare le lesioni epatiche da ascaridi. La distribuzione delle macchie bianche è stata esaminata in 190 fegati, considerando entrambe le facce ed i singoli lobi. La rete neurale artificiale è stata addestrata con 2169 immagini, annotando varie classi: fegato, cistifellea, macchie bianche, fibrosi estesa, artefatti da illuminazione. Le prestazioni della rete sono state valutate in termini di *Intersection over Union*, sensibilità e specificità.
Nel complesso, i punteggi assegnati alla superficie diaframmatica dei lobi mediali correlano fortemente, in modo statisticamente significativo, con lo *score* totale assegnato al fegato. Al momento, la rete neurale artificiale dimostra una specificità pari all'85% ed una sensibilità complessiva pari al 79%. La sensibilità è più elevata nel caso di lesioni epatiche gravi (87%). L'ampliamento del *dataset*, in corso, consentirà di migliorare ulteriormente le prestazioni della rete neurale artificiale.

Abstract
Ascaris suum *larvae cause hepatic lesions (white spots), which are commonly found in slaughtered pigs and scored to estimate the severity of ascariasis. Here, we report our investigations aiming to: a) assess the distribution of white spots on the liver surface; b) train an artificial neural network, capable of recognizing and scoring white spots. The distribution of white spots has been examined in 190 livers, considering both sides and each single lobe. The artificial neural network has been trained with 2169 images, annotating different classes: liver, gallbladder, white spots, diffuse fibrosis, and artefacts. The performances of the artificial neural network have been assessed in terms of Intersection over Union, sensitivity, and specificity.*

Overall, the scores assigned to the diaphragmatic surface of the medial lobes strongly and significantly correlate with the total score assigned to the liver. Currently, the artificial neural network demonstrates a specificity of 85% and an overall sensitivity of 79%. Sensitivity is higher in the case of severe liver lesions (87%). The ongoing augmentation of the dataset will further improve the performances of the artificial neural network.

INTRODUZIONE

L'ascaridiosi è sostenuta dal nematode *Ascaris suum* e rappresenta una delle poche parassitosi di rilievo nell'allevamento intensivo del suino. Il ciclo biologico di *A. suum* è diretto. Gli adulti hanno grandi dimensioni (25-40 cm di lunghezza) e vivono liberi nel lume del piccolo intestino, opponendosi alla peristalsi con movimenti attivi. Le uova vengono escrete con le feci e sono estremamente resistenti nell'ambiente esterno, dove diventano infettanti (stadio larvale L2/L3) nell'arco di 3-4 settimane. Una volta ingerite, le larve compiono una complessa migrazione entero-epato-pneumo-enterica, diventano adulti in circa 15 giorni e sopravvivono per 6-9 mesi. Nel tempo, i suini infetti sviluppano immunità specifica protettiva nei confronti di *A. suum*, riuscendo a intrappolare e distruggere le larve all'interno di granulomi. Anche per questo motivo, l'ascaridiosi tende a prevalere nei suini più giovani, di 3-6 mesi di età (Zimmermann et al., 2019).

Gli adulti di *A. suum* competono con l'ospite per le sostanze nutritive contenute nell'alimento (azione sottrattiva), senza indurre lesioni significative a livello intestinale. Per contro, le larve stimolano una intensa reazione infiammatoria durante la loro migrazione. In particolare, le larve causano una epatite interstiziale cronica eosinofila, migrando attraverso il parenchima epatico. Macroscopicamente, le lesioni epatiche da ascaridi possono essere distinte in due tipologie: a) cosiddette "macchie bianche", a margini sfumati, caratterizzate dall'ispessimento dello stroma interlobulare; b) lesioni a carattere linfoproliferativo ("noduli del *Kisselev*"), di piccole dimensioni, biancastre e rilevate, costituite da grappoli di follicoli linfatici terziari al cui interno sono spesso inglobati granulomi e residui larvali (Marcato, 1998; Martelli, 2013). Le macchie bianche sono di comune riscontro nei suini macellati, con prevalenze variabili e talvolta prossime al 100% (Vismara et al., 2023); la loro quantificazione è utile per monitorare la presenza di *A. suum* in allevamento e l'efficacia delle misure terapeutiche messe in atto (Martelli, 2013).

Le reti neurali artificiali convoluzionali (*Convolutional Neural Networks*, CNN) sono attualmente riconosciute come lo stato dell'arte della *computer vision*, sottoinsieme dell'intelligenza artificiale (IA) adatto a risolvere compiti visivi altamente ripetitivi (Voulodimos et al., 2018). Il presente studio si pone l'obiettivo di valutare la distribuzione delle macchie bianche sulla superficie epatica, prerequisito fondamentale per la successiva automatizzazione della loro punteggiatura. Inoltre, si riportano i dati preliminari ottenuti addestrando una CNN, allo scopo di identificare e quantificare le lesioni epatiche da ascaridi nei suini al macello.

MATERIALI E METODI

Animali

Tutte le indagini oggetto del presente contributo sono state condotte su fegati di suini macellati in stabilimenti del centro-nord Italia.

Distribuzione delle macchie bianche sulla superficie epatica

Sono stati presi in esame 190 fegati patologici, vale a dire con lesioni riferibili ad ascaridiosi epatica. Ogni fegato è stato ispezionato attentamente su entrambe le facce (diaframmatica

e viscerale) e suddiviso in quadranti, corrispondenti ai lobi epatici (laterale destro, mediale destro, mediale sinistro e laterale sinistro). A ciascun lobo è stato attribuito un punteggio, variabile da 0 a 2: punteggio 0 in caso di assenza di lesioni; punteggio 1 in presenza di una singola macchia bianca; punteggio 2 nel caso di un numero di macchie bianche uguale o superiore a due. I dati sono stati riportati su un foglio di calcolo *Microsoft*© *Excel* e sottoposti ad analisi statistica (test di *Spearman*).

Addestramento di una rete neurale artificiale per l'identificazione e la punteggiatura delle macchie bianche

Ad oggi, sono stati oggetto di studio 2169 fegati. Inizialmente, sono state collezionate le immagini digitali (una per ciascun suino), utilizzando la fotocamera di un i-Phone SE in funzione *live*, senza interferire con la normale progressione della catena di macellazione (Figura 1).

Figura 1. Immagine digitale acquisita in catena di macellazione. Il fegato, appeso ad un gancio con il resto della corata, tende spontaneamente a chiudersi su sé stesso, lasciando esposta la faccia diaframmatica nella sua porzione centrale.

Le immagini sono state successivamente annotate (*annotation tool* "labelme") da tre operatori, che hanno ripetutamente concordato e uniformato le modalità di interpretazione delle immagini. Dopo una serie di valutazioni preliminari, tenuto conto dei potenziali fattori confondenti, si è deciso di annotare le seguenti classi: "*liver*", il profilo esterno del parenchima epatico; "*gallbladder*", il profilo della cistifellea, qualora visibile; "*artifacts*", gli artefatti causati dal riflesso delle luci artificiali sulla superficie epatica; "*white spot*", le macchie bianche riferibili alla migrazione delle larve di *A. suum*, annotate singolarmente; "*diffuse fibrosis*", classe resasi necessaria poiché nelle infezioni più gravi le lesioni tendono a fondersi fra di loro, rendendo complicata l'annotazione come singole "*white spot*".

Le immagini annotate sono state somministrate alla CNN per addestrarla ("*training set*", costituito da 1845 immagini) e valutarne il grado di apprendimento ("*test set*", costituito da 324 immagini). Sono state utilizzate due CNN, denominate U-Net e U-Net++ (encoder Resnet18), reti neurali di comune impiego per la segmentazione delle immagini in campo

biomedico. Durante la fase di addestramento, sono stati svolti numerosi esperimenti indipendenti con immagini di varie dimensioni (448x320, 512x384, 1040x768 pixels), per verificare se ciò avesse o meno un effetto sull'apprendimento della CNN. Nel caso delle immagini di dimensioni maggiori (1040x768 pixels), si è cercato di facilitare il lavoro della CNN impiegando vari accorgimenti (es. "*image patches*", "*bounding box*", "*background suppression*"). Inoltre, per accelerare ulteriormente l'addestramento, è stata sfruttata una libreria di *pytorch*, enorme collezione di immagini utilizzate per il *training* preliminare delle CNN.
Le prestazioni della CNN sono state valutate in termini di *Intersection over Union* (IoU), sensibilità e specificità. Tenuto conto della letteratura disponibile (Straw et al., 1999; Martelli, 2013), le previsioni della CNN sono state espresse secondo la griglia di seguito specificata: a) fegati sani, nei quali l'operatore non ha identificato alcuna macchia bianca e/o aree di "fibrosi diffusa"; b) fegati lievemente parassitati, con numero di macchie < 4; c) fegati gravemente parassitati, con >4 macchie e/o aree di "fibrosi diffusa".

RISULTATI

Distribuzione delle macchie bianche sulla superficie epatica

Nell'insieme, le macchie bianche sono risultate più frequenti sulla faccia diaframmatica del fegato, come rappresentato graficamente in Figura 2.

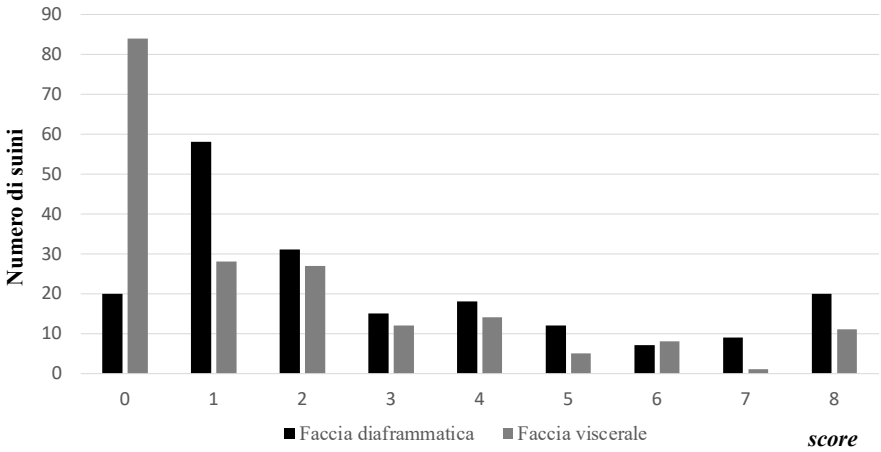


Figura 2. Distribuzione delle macchie bianche sulle due facce del fegato. Il numero delle facce viscerali prive di macchie bianche (*score* 0) supera di gran lunga quello delle facce diaframmatiche. Per contro, il numero di fegati con macchie bianche sulla faccia diaframmatica è pressoché costantemente superiore, indipendentemente dal punteggio totale (unica eccezione *score* 6).

L'analisi statistica dei dati ha evidenziato una correlazione di media entità e statisticamente significativa fra i punteggi attribuiti alla faccia diaframmatica e viscerale ($R = 0.571$, $p<0.00001$), come pure fra i punteggi attribuiti a ciascun lobo epatico ($0.428<R<0.623$, $p<0.00001$). La somma dei punteggi attribuiti alla superficie diaframmatica dei lobi mediali (destro e sinistro) ha dimostrato una forte correlazione, statisticamente significativa, con il punteggio totale assegnato al fegato ($R = 0.806$, $p<0.00001$).

Addestramento di una rete neurale artificiale per l'identificazione e la punteggiatura delle macchie bianche

La CNN ha mostrato prestazioni migliori esaminando immagini di dimensioni maggiori (1040x768 pixels), riconoscendo perfettamente il profilo epatico e la colecisti (IoU = 98%). I valori di IoU sono stati, invece, inferiori per il profilo delle macchie bianche (70%) e degli artefatti da illuminazione (63%). Al momento, la CNN ha una specificità pari all'85% ed una sensibilità complessiva pari al 79%. Come mostra la Figura 3, la sensibilità è decisamente più elevata nel caso di lesioni gravi (97 immagini predette correttamente su un totale di 111, pari all'87%), mentre la CNN ha commesso molti errori sulle lesioni di lieve entità (7 immagini predette correttamente su un totale di su 20, pari al 35%).

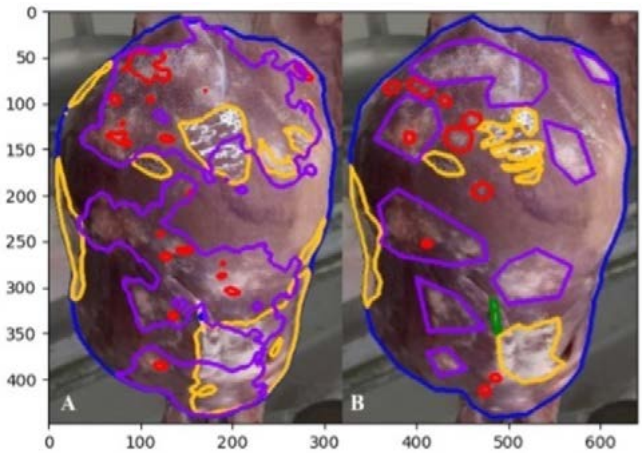


Figura 2. Predizione da parte della CNN (A) *vs* immagine annotata manualmente dall'operatore (B). Come si può notare dal confronto, la CNN non ha difficoltà a riconoscere lesioni molto gravi ed estese (viola), sebbene con profili differenti, che penalizzano l'IoU ma non lo *score* complessivo.

DISCUSSIONE

Le enormi potenzialità dell'IA in ambito biomedico, più in particolare nell'interpretazione di immagini complesse di significato diagnostico, sono ormai un dato di fatto. L'applicazione della *computer vision* sembra particolarmente interessante per la raccolta di dati in sede di macellazione, allorquando si chieda alla CNN di esprimere sistematicamente un giudizio complessivo su partite di animali (Trachtman et al., 2020).

I sistemi di *score* in uso per l'ascaridiosi epatica si basano su un principio semplice e plausibile: maggiore è il numero di larve che migrano attraverso il fegato, più numerose saranno le macchie bianche, più grave sarà il danno provocato da *A. suum*. I dati delle nostre indagini dimostrano che l'esame della faccia diaframmatica del fegato, e più nello specifico della sua parte centrale corrispondente ai lobi mediale destro e sinistro, è sufficientemente rappresentativo del punteggio complessivo assegnato. Pertanto, le foto più semplici da acquisire in sede di macellazione risultano idonee all'addestramento della CNN ed all'automatizzazione del processo. Inoltre, in accordo con quanto precedentemente pubblicato da altri autori (McKenna et al., 2020), il nostro studio indica che la CNN può essere addestrata con successo per riconoscere e quantificare le macchie bianche da ascaridi.

Di fatto, le prestazioni della CNN sono già soddisfacenti in termini di specificità e sensibilità nel caso delle lesioni più gravi. In prospettiva, l'ampliamento del *dataset*, attualmente in corso, dovrebbe garantire risultati migliori anche per la punteggiatura di lesioni discrete.
Un discorso a parte meritano i valori di IoU, al momento piuttosto bassi per le classi "*white spots*" e "*artifacts*". A tal proposito, vale la pena specificare che l'IoU misura, in termini percentuali, quanto il profilo predetto dalla CNN coincida con quello disegnato manualmente dall'operatore in fase di annotazione. Pertanto, non stupisce osservare valori di IoU inferiori alle attese per "oggetti" (es. macchie bianche e riflessi luminosi) caratterizzati da margini sfumati, non ben definiti e per tale ragione piuttosto variabili, anche nel caso in cui vengano disegnati da operatori attenti ed esperti. L'ampliamento del dataset verosimilmente migliorerà le prestazioni della rete anche in termini di IoU. Tuttavia, la corretta identificazione delle lesioni e degli artefatti riveste un significato di gran lunga più importante rispetto alla loro perfetta delimitazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Marcato P.S. (1998) "Patologia suina", Bologna, Edagricole.
2. Martelli P. "Le patologie del maiale", Milano, Point Veterinaire Italie.
3. McKenna S., Telmo A., Kyriazakis I. (2020) "Automated classification for visual-only post-mortem inspection of porcine pathology". IEEE T-ASE, 1–13.
4. Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (1999) "Diseases of Swine", 8a ed., Hoboken, NJ, Wiley Blackwell.
5. Trachtman A.R., Bergamini L., Palazzi A., Porrello A., Capobianco Dondona A., Del Negro E., Paolini A., Vignola G., Calderara S., Marruchella G. (2020) "Scoring pleurisy in slaughtered pigs using convolutional neural network"s. Vet Res. 51(1), 51.
6. Vismarra A., Lenti A., Genchi M., Kramer L., Geldhof P. (2023) "Seroprevalence of *Ascaris suum* compared to milk spot prevalence at slaughter in Italian fattening pigs". Vet Parasitol Reg Stud Reports. 100828.
7. Voulodimos A., Doulamis N., Doulamis A., Protopapadakis E. (2018) "Deep learning for computer vision: A brief review". Comput Intell Neurosci. 7068349
8. Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., Zhang J. (2019) "Diseases of Swine", 11a ed., Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell.

LESIONI AURICOLARI NEI SUINI AL MACELLO: INDAGINI PRELIMINARI MEDIANTE STRUMENTI *OPEN SOURCE* DI INTELLIGENZA ARTIFICIALE

EAR LESIONS IN SLAUGHTERED PIGS: PRELIMINARY DATA USING OPEN SOURCE ARTIFICIAL INTELLIGENCE-BASED TOOLS

D'ANGELO M.,[1] CECCHINI C.,[1] GUARNIERI C.,[2] SCIOTA D.,[1] HATTAB J.,[1] ROSAMILIA A.,[3] OLIVASTRI A.,[4] MARRUCHELLA G.[1]

[1]Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Teramo, Loc. Piano d'Accio, 64100; [2]Azienda Unità Sanitaria Locale di Modena, via San Giovanni del Cantone 23, 41121, Modena; [3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini" (IZSLER), 25124 Brescia; [4] Azienda Sanitaria Territoriale di Ascoli Piceno, Via degli Iris snc 63100 Ascoli Piceno

Parole chiave: benessere, lesioni auricolari, intelligenza artificiale
Keywords*: welfare, ear lesions, artificial intelligence*

Riassunto
L'identificazione e la quantificazione di alcune lesioni cutanee (es. cicatrici, esiti di morsicature, necrosi, bursiti) possono essere estremamente utili per stimare il livello di benessere dei suini in allevamento. A tal proposito, le tecnologie basate sull'intelligenza artificiale potrebbero essere applicate con successo per acquisire dati in modo sistematico, economicamente sostenibile e sull'intera popolazione di riferimento. Il nostro studio ha avuto l'obiettivo di addestrare una rete neurale artificiale *open source* ("TensorFlow", Keras) per identificare lesioni auricolari croniche, caratterizzate da perdita di tessuto. Ad oggi, sono state impiegate le immagini di 2670 padiglioni auricolari: 1870 immagini sono state usate nella fase di addestramento, mentre le restanti 790 sono state usate per verificare il grado di apprendimento della rete neurale artificiale. Quest'ultima ha interpretato correttamente 765 immagini, di cui 611 "sane" e 154 "patologiche", con valori di accuratezza prossimi al 97%. Nel complesso, i risultati preliminari sembrano molto promettenti. Tuttavia, si rende necessario un ulteriore ampliamento e diversificazione del *dataset*, al fine di garantire una maggiore affidabilità della rete neurale in tutte le diverse circostanze possibili.

Abstract
The identification and scoring of skin lesions (e.g. scars, bites, necrosis, bursitis) can be very useful to estimate welfare in pig herds. In this respect, artificial intelligence-based technologies could be successfully applied to acquire data in a systematic and cost-effective manner, on the entire animal population. This study aimed to train an open-source artificial neural network (TensorFlow, Keras) to identify chronic ear lesions, characterized by tissue loss. To date, images of 2670 pinnae have been used: 1870 images were used in the training phase, while the remaining 790 were used to test the performance of the artificial neural network. The latter correctly interpreted 765 images, of which 611 were 'healthy' and 154 'diseased', with accuracy values close to 97%. Overall, preliminary results seem very promising. However, further increase and diversification of the dataset is necessary to ensure greater reliability of the neural network under different conditions.

INTRODUZIONE

La crescente sensibilità dei consumatori nei confronti del benessere animale incide profondamente sul settore zootecnico, spesso attraverso l'intermediazione del legislatore. La valutazione

del benessere si basa sulla registrazione di una serie di dati relativi agli animali (es. parametri comportamentali e sanitari) e all'ambiente che li ospita (es. microclima e affollamento). Tuttavia, è sempre attuale la ricerca di nuovi indicatori, che possano rispondere a questa esigenza in modo più efficace ed efficiente. Da questo punto di vista, i rilievi effettuati in sede di macellazione offrono interessanti prospettive. In particolare, alcune lesioni visibili sulla carcassa sono ritenute parametri "*iceberg*" del benessere dei suini in allevamento (es. cicatrici, esiti di morsicature, necrosi, bursiti). Ad esempio, il protocollo *Welfare Quality*® prevede la valutazione della cute dei suini al macello, suddividendo la carcassa in 5 parti, una delle quali coincide con il padiglione auricolare (De Luca et al., 2021). L'applicazione del protocollo *Welfare Quality*® fornisce informazioni valide, ma non è praticabile sistematicamente negli stabilimenti di macellazione ad elevata capacità produttiva. A tal proposito, le tecnologie basate sull'intelligenza artificiale (IA) si propongono come un valido ausilio, idoneo ad acquisire dati in modo sistematico, economicamente sostenibile e sull'intera popolazione di riferimento (Trachtman et al., 2020).
Il nostro studio ha avuto l'obiettivo di addestrare una rete neurale artificiale di tipo convoluzionale (*Convolutional Neural Network*, CNN) per identificare lesioni auricolari croniche, caratterizzate dalla perdita più o meno estesa di tessuto.

MATERIALI E METODI

Animali

Tutte le indagini oggetto del presente contributo sono state condotte su carcasse di suini macellati presso stabilimenti del centro e del nord Italia.

Acquisizione ed etichettatura delle immagini

Le immagini sono state acquisite da diversi operatori in catena di macellazione, utilizzando le fotocamere di vari tipi di *smartphone*. Ogni fotografia ha incluso la superficie esterna di entrambi i padiglioni auricolari, la testa e parte del collo della carcassa, previo passaggio in vasche di scottatura, flambatura e spazzolatura (Figura 1A). Due medici veterinari hanno esaminato le immagini e concordato il giudizio (sano *vs* patologico) per ciascun padiglione auricolare, senza alcuna annotazione. Al momento, i padiglioni auricolari eccessivamente danneggiati durante le operazioni di macellazione (tagli profondi, lacerazioni cutanee estese) sono stati esclusi dallo studio (Figura 1B).

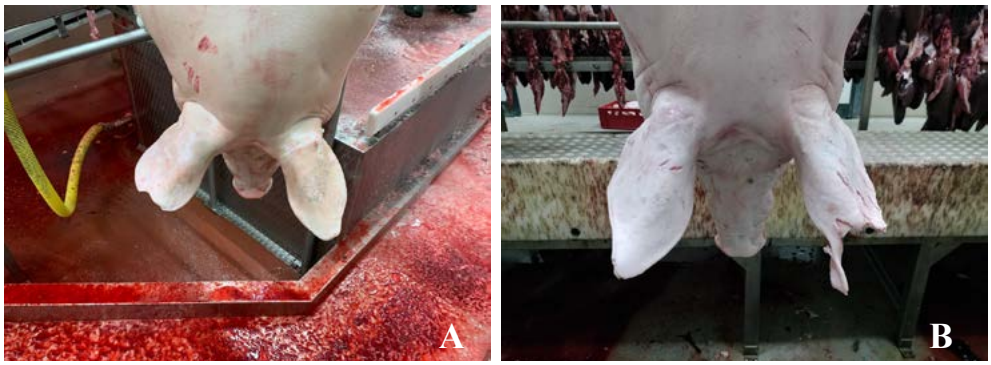


Figura 1. Immagine acquisite in catena di macellazione. L'immagine sulla sinistra (A) è stata ritenuta idonea e inserita nel *dataset*. Il profilo del padiglione auricolare destro è chiaramente alterato, con perdita di sostanza in corrispondenza della sua porzione apicale. Nell'immagine (B) il padiglione auricolare sinistro è stato strappato durante la spazzolatura della carcassa. Di conseguenza, l'immagine per il momento è stata esclusa dal *dataset*.

Addestramento di una CNN per l'identificazione delle lesioni auricolari
Ad oggi, sono state impiegate 1335 fotografie, per un totale di 2670 padiglioni auricolari. In particolare, 1870 padiglioni auricolari sono stati usati per addestrare la CNN (*dataset* di addestramento), mentre i restanti 790 sono stati usati per verificare il grado di apprendimento della CNN (*dataset* di test).
Allo scopo, è stato utilizzato un modello sequenziale *open source* distribuito da *Keras* ("*TensorFlow*") che, pur necessitando di un singolo *input* per volta, è capace di svolgere il compito richiesto in modo rapido e leggero. Il modello impiegato permette di salvare i pesi ottenuti in fase di addestramento e di esportarli in un file di estensione propria (.keras), per essere riutilizzati e distribuiti (https://keras.io).
Preliminarmente, le immagini sono state processate attraverso una *suite* di routine, atta a ritagliare il profilo dei padiglioni auricolari, sostituendo le parti "non rilevanti" con uno sfondo nero. Quest'ultimo permette di meglio evidenziare la presenza di eventuali lesioni e rende l'addestramento più efficiente.
Le predizioni della CNN sono state esportate in un file di *Microsoft*Ò *Excel* e le prestazioni espresse in termini di accuratezza, considerando il giudizio dei medici veterinari come *gold standard*.

RISULTATI
Le prestazioni della CNN, testate su due computer differenti, sono state in entrambi i casi soddisfacenti, con valori di accuratezza variabili dal 96,8% al 96.94%. In totale, la CNN ha interpretato correttamente 765 padiglioni auricolari, di cui 611 "sani" e 154 "patologici". Per contro, la CNN ha valutato erroneamente 25 padiglioni auricolari: più in dettaglio, la CNN ha identificato 7 "falsi patologici", mentre in 18 casi non ha riconosciuto correttamente la presenza di lesioni.

DISCUSSIONE
I dati raccolti confermano che l'IA può assolvere con successo compiti semplici e ben definiti, rendendo possibile l'acquisizione sistematica di informazioni relative allo stato sanitario e al benessere degli animali da reddito. Nel caso specifico, la valutazione del profilo auricolare si è rivelata piuttosto semplice e praticabile con strumenti *open source*, molto economici e potenzialmente alla portata di tutti. Ciò premesso, riteniamo utile analizzare i limiti dello studio e le sue potenziali evoluzioni.
A nostro avviso, l'ostacolo principale è rappresentato dagli artefatti (lacerazioni, tagli, strappamenti) che si determinano prevalentemente durante la spazzolatura delle carcasse. Tali artefatti sembrano piuttosto comuni e alterano il profilo auricolare, complicando il lavoro della CNN. Il problema può essere affrontato addestrando la CNN con immagini *ad hoc*, che sono già nella nostra disponibilità e verranno a breve utilizzate allo scopo di ampliare e perfezionare le competenze della rete. Tuttavia, non è da escludere un diverso posizionamento della fotocamera, con acquisizione delle immagini prima della spazzolatura della carcassa. Per quanto nella nostra esperienza, gli stessi artefatti potrebbero complicare anche altre griglie di *score* (es. code), soprattutto negli stabilimenti di macellazione che adottano sistemi di spazzolatura orizzontali e/o troppo "energici".
Il secondo problema, in parte collegato al precedente, riguarda la composizione del *dataset*, attualmente sbilanciato verso i padiglioni auricolari sani. Le prestazioni della CNN sono già di gran lunga superiori rispetto alla soglia di soddisfazione comunemente accettata (accuratezza >85%). Tuttavia, l'ampliamento del *dataset*, un numero maggiore di lesioni di varia entità, nonché l'inserimento di immagini non idonee, si rendono indispensabili per garantire un'affidabilità ancora maggiore della CNN in tutte le diverse circostanze possibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Bertoni G. (2007) “Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo”, Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia.
2. De Luca S., Zanardi E., Alborali G.L., Ianieri A., Ghidini S. (2021) “Abattoir-Based Measures to Assess Swine Welfare: Analysis of the Methods Adopted in European Slaughterhouses”. Animals (Basel) 11(1), 226.
3. Trachtman A.R., Bergamini L., Palazzi A., Porrello A., Capobianco Dondona A., Del Negro E., Paolini A., Vignola G., Calderara S., Marruchella G. (2020) “Scoring pleurisy in slaughtered pigs using convolutional neural network”s. Vet Res. 51(1), 51.

SIEROTIPIZZAZIONE DEI CEPPI DI GLAESSERELLA PARASUIS ISOLATI IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA NEL PERIODO 2013-2023

SEROTYPING OF GLAESSERELLA PARASUIS STRAINS ISOLATED IN NORTHERN ITALY FARMS FROM 2013 TO 2023

PUPILLO G., BARISELLI S., ZULIANI R., GHERPELLI Y., DE LORENZI ., DOTTORI M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – sezione di Reggio Emilia

Parole chiave: Glaesserella parasuis, malattia di Glässer, sierotipi
Keywords: Glaesserella parasuis, Glässer's Disease, serovar

Riassunto
Da Gennaio 2013 a Dicembre 2023, un totale di 130 ceppi di *Glaesserella parasuis* isolati da tessuti patologici di suino durante l'attività diagnostica di routine dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), sono stati sierotipizzati presso la sezione di Reggio Emilia dell'ente, mediante la metodica agar gel immunodiffusione (AGID). In letteratura sono descritti 15 sierotipi di *G. parasuis*, cui si aggiungono ceppi non sierotipizzabili, con diverso grado di virulenza e tropismo. Gli antisieri utilizzati dal laboratorio permettono di identificare i sierotipi 1, 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14 e 15. Nel periodo di studio considerato, il sierotipo 4 è risultato il prevalente (25.4%), seguito dal sierotipo 13 (7,7%). Settantasei ceppi sono risultati non tipizzabili (58.5%). I ceppi sono stati divisi in 2 gruppi, in base all'isolamento da lesioni riferibili a forma setticemica o da lesioni associate al solo comparto respiratorio. Sulla base di questa ripartizione è stata valutata l'associazione di determinati sierotipi a specifiche lesioni. Da questa valutazione è emerso come il sierotipo 13 sia principalmente associato a forme setticemiche. I dati relativi al profilo di sensibilità agli antimicrobici è riportato per i ceppi isolati nel biennio 2022-2023, per i quali la suscettibilità agli antibiotici è stata valutata mediante metodica di microdiluizione in brodo (MIC). I risultati ottenuti mettono in evidenza una diffusa sensibilità alla maggior parte delle classi di molecole testate.

Abstract
From January 2013 to December 2023, a total of 130 *Glaesserella parasuis* strains isolated from pigs were serotyped using agar gel diffusion test (GD) in Reggio Emilia department of *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. G. parasuis* is classified in 15 recognized serovars and non-typeable strains, with different and no constant virulence and tropism profile. The antisera used in GD test were limited to serovars 1, 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15, traditionally considered virulent, assigning to Non-Typeable group the remaining strains. Serovar 4 was the most prevalent (25,4%), followed by serovar 13 (7,7%). Seventy-six strains were non-typeable (58,5%). The strains were divided into two categories, depending on the site of isolation, obtaining the group isolated from pathological lesions of systemic disease or from the lower respiratory tract of pigs suffering from bronchopneumonia. Then we tried to assess if a certain serovar had a specific tropism, revealing only for serovar 13 a statistic association with systemic infection. Data on antibiotic susceptibility of the strains isolated between 2022-2023 were obtained by determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), using broth-microdilution method. The result shows a wide distribution of antibiotic susceptibility profile.

INTRODUZIONE

Glaesserella parasuis (GPS) è l'agente eziologico della polisierosite, meningoencefalite e artrite fibrinosa del suino, anche nota come Malattia di Glässer (MG). Un tempo la MG era considerata una malattia sporadica dei suinetti immunocompromessi da fattori stressogeni, visto che GPS è un commensale delle alte vie respiratore dei suini allevati (Møller et al., 1993). Con il tempo però è emerso e si è affermato il ruolo di GPS come responsabile (o coresponsabile) di malattia ad eziologia batterica nell'allevamento suino in tutto il mondo. Infatti, GPS oltre ad essere l'agente eziologico primario della MG rientra tra gli agenti del complesso della malattia respiratoria del suino (Brockmeier et al., 2002). I dati in bibliografia sulla associazione tra uno specifico sierotipo e il tipo di lesioni provocate sono discordanti (Olvera et al., 2007, Angen et al., 2004, Luppi et al., 2011), probabilmente derivante dalla variabilità genetica di GPS e dalla nota differenza di virulenza di ceppi appartenenti allo stesso sierotipo (Angen et al., 2004). Ad oggi sono riconosciuti 15 sierotipi, ma circolano anche numerosi ceppi non tipizzabili sierologicamente (NT). Sebbene siano stati sviluppati alcuni protocolli di biologia molecolare per la valutazione del sierotipo e dei fattori di virulenza, molti dei dati disponibili sul sierotipo sono storicamente ottenuti mediante sierotipizzazione utilizzando antisieri iperimmuni nella metodica di agar gel immunodiffusione (AGID) e/o test di emoagglutinazione indiretta (IHA). Il sierotipo assegnato al ceppo ha permesso in passato la sua classificazione in un'ottica di patogenicità. È stata dimostrata da Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992) la relazione tra sierotipo e grado di virulenza, che ha portato storicamente a considerare i sierotipi 1, 5, 10, 12, 13, e 14 come letali entro 96 ore dall'inoculo, i sierotipi 2, 4, 15 come determinanti le tipiche lesioni di polisierosite, il sierotipo 8 come mediamente virulento ed i sierotipi 3, 6, 7, 9, 11 come avirulenti. Ad oggi con l'avvento di nuove metodiche biomolecolari questa classificazione è in alcuni casi ancora valida (vedi sierotipo 6 e 9, isolati principalmente da tamponi nasali di animali sani), invece è ormai appurato che tra i sierotipi tradizionalmente considerati virulenti esistano ceppi a ridotta patogenicità e viceversa, come nel caso del sierotipo 7 ed alcuni ceppi NT isolati in corso di MG e alberganti fattori di patogeicità (Schuwerk et al., 2020). In generale l'infezione in allevamento può essere controllata mediante trattamento antibiotico e vaccinazione. La profilassi vaccinale può essere effettuata utilizzando prodotti commerciali o vaccini stabulogeni; in quest'ottica conoscere il sierotipo circolante permette di poter scegliere tra le due opzioni, vista la mancanza di cross-protezione tra diversi sierotipi, confermata soltanto per alcune combinazioni di essi (Schuwerk et al., 2020). Inoltre il vaccino stabulogeno offre la possibilità di utilizzare ceppi NT se frequentemente isolati nel contesto aziendale da campioni patologici. La prevalenza dei diversi sierotipi di GPS è stata studiata in molti Paesi del mondo a forte tradizione suinicola e studi recenti indicano i sierotipi 1, 4, 5/12 e 7 come i più frequentemente isolati, indicando con 5/12 dei ceppi che con la metodica di PCR applicata non sono distinguibili (Macedo et al., 2021). Questo studio ha l'obiettivo di aggiornare la prevalenza dei diversi sierotipi di GPS circolanti in nord Italia, di valutare l'associazione tra sierotipo e sito di isolamento e valutare la sensibilità agli antimicrobici dei ceppi isolati nell'ultimo biennio.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nella seguente trattazione i ceppi di GPS isolati dal 2013 al 2023 e per i quali è stato possibile eseguire la sierotipizzazione presso la sezione territoriale di Reggio Emilia dell'IZSLER. Trattandosi di uno studio retrospettivo di analisi eseguite su richiesta di privati, l'esame colturale è stato eseguito sul materiale conferito in autocontrollo, che per alcune caratteristiche di campionamento (es. materiale mal conservato, congelato, esemplare sottoposto a trattamento antibiotico) potrebbero non permettere una corretta stima della prevalenza di GPS negli allevamenti e negli anni analizzati. Inoltre il microrganismo in esame è considerato

un batterio 'esigente' il cui isolamento, soprattutto in presenza di flora contaminante, non è agevole. La metodica di sierotipizzazione utilizzata è ad oggi, con l'avvento di metodiche di biologia molecolare, meno performante nell'individuare correttamente i sierotipi e soprattutto nell'assegnare a determinati sierotipi i ceppi NT. Per la valutazione dell'antimicrobico sensibilità vengono considerati i ceppi isolati nel biennio 2022-23, poiché analizzati utilizzando la metodica della MIC in brodo. 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; grazie a questo dato, raccolto in sede di esame anatomopatologico o riferito in anamnesi se il conferimento era di soli tamponi eseguiti su versamenti cavitari, è stato possibile individuare per i diversi ceppi isolati se si trattasse di un isolamento dal solo contesto respiratorio in corso di affezione delle basse vie respiratorie o da un quadro generalizzato, caratteristico della MG.

Esame colturale

I campioni da sottoporre all'esame batteriologico sono seminati su terreno Agar globuli addizionato con β-nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) (AG+C), Hektoen enteric agar (HEA) ed agar siero (AS). Per aumentare le possibilità di isolamento di GPS sul terreno AG+C è stato seminato, perpendicolarmente allo striscio eseguito, un ceppo da collezione di *Staphylococcus aureus*. Si creano così migliori condizioni per l'isolamento di GPS che crescerà maggiormente nell'area più vicina allo *S. aureus* (definita crescita satellite). I terreni HEA e AS sono 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_2 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 GPS, ovvero colonie piccole a 24 e 48 ore, non emolitiche, grigiastre, rotondeggianti, presenti su AG+C, non presenti su HEA e AS, sono sottoposte a conferma definitiva mediante PCR tradizione specifica per GPS come descritto da Oliveira e collaboratori (2001).

Concentrazione minima inibente (MIC)

L'antibiogramma è stato eseguito su colonie trapiantate su AG+C, dopo 24 ore di incubazione a 37 ± 1 °C. La metodica utilizzata è quella della MIC in brodo, utilizzando le molecole incluse nel pannello previsto di routine per i patogeni respiratori ed i parametri interpretativi, come riportato in tabella 2 e 3. La lettura è stata eseguita dopo 24 ore di incubazione in termostato a 35 ± 1 °C.

Sierotipizzazione

Il sierotipo è stato determinato mediante metodica AGID, utilizzando antisieri iperimmuni di coniglio specifici per i sierotipi 1, 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15 ed antigeni autoclavati come descritto da Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992). Nello specifico, il ceppo da testare viene autoclavato, riuscendo così ad ottenere una sospensione di antigene batterico termostabile che, tramite diffusione in gel di agar, viene messo a contatto con i diversi sieri iperimmuni. In presenza di un siero che contenga anticorpi specifici per il ceppo in esame, si evidenzia dopo 24 ore di incubazione a 25°C, una banda di agglutinazione sierotipo specifica. In assenza di banda il ceppo viene considerato Non Tipizzabile (NT).

Analisi statistica

Per ogni sierotipo, quando il numero di isolati era maggiore o uguale a 10, è stata valutata l'eventuale correlazione statistica tra sierotipo e sito di isolamento, considerando per quest'ultimo 2 macroclassi: isolamento da esemplari con forma sistemica (polisierosite,

artrite o meningite) o con forma soltanto respiratoria (broncopolmonite da catarrale a purulenta). L'eventuale correlazione tra le due variabili è stata valutata tramite il test del chi-quadrato, considerando come statisticamente significativi livelli di probabilità inferiori a 0,05. In particolare, è stata costruita una tabella a doppia entrata tramite il software Microsoft Excel, in cui una colonna presentava il conteggio di animali con malattia in forma sistemica e l'altra il conteggio di animali con malattia in forma soltanto respiratoria. Ciascuna riga corrispondeva a un sierotipo tra quelli considerati in base ai criteri di selezione sopra citati. Confrontando quindi i valori osservati con quelli attesi per l'ipotesi H_0 "sierotipo non influente nella distribuzione di malattia respiratoria vs malattia sistemica, con eventuali differenze dovute al solo caso", si è calcolato per ciascun sierotipo il valore di probabilità P del test statistico per confutare o accettare l'ipotesi H_0.

RISULTATI

Da gennaio 2013 a dicembre 2023 un totale di 130 ceppi di GPS sono stati isolati e sierotipizzati (Tabella 1). Il sierotipo 4 è risultato essere il prevalente (25,4%), seguito dal sierotipo 13 (7,7%). La maggior parte degli isolati (58,5%) è risultato non sierotipizzabile mediante AGID. I sierotipi 1, 2, 10, 12, 14 e 15 rappresentano, se sommati, meno del 10% dei ceppi isolati. La suddivisione dei ceppi in 2 gruppi, in base all'isolamento da casi di MG e dunque da forma setticemica (polisierosite, artrite o meningite) o dalle sole vie aree profonde in associazione a quadri di broncopolmonite, mostra una maggioranza (57%) di isolamento in casi di MG. La frequenza di isolamento del sierotipo 13 da suini con la forma sistemica è stata significativamente più alta rispetto all'isolamento dello stesso sierotipo in forma respiratoria (P=0,037). La frequenza di isolamento del sierotipo 4 da suini con o senza MG è stata simile, non avendo significatività statistica per una delle 2 variabili (P=0,494). I dati relativi alla sensibilità agli antimicrobici, al range di concentrazione delle molecole testate ed i relativi Break-point sono riportati in tabella 2 e 3.

Tabella 1. *Prevalenza dei sierotipi di Glaesserella parasuis isolati e suddivisione in base alle lesioni macroscopiche*
Table 1*. Glaesserella parasuis serovars prevalence and distribution between the two main gross lesions categories*

Sierotipo	Lesione macroscopica		Totale
	polisierosite	brocopolmonite	
	n. di ceppi	n. di ceppi	
1	1	1	2 (1,5%)
2	1	1	2 (1,5%)
4	17	16	33 (25,4%)
5	2	1	3 (2,3%)
12	0	1	1 (0,8%)
13	9	1	10 (7,7%)
14	1	1	2 (1,5%)
15	0	1	1 (0,8%)
NT	43	33	76 (58,5%)
Totale	**74**	**56**	**130**

Tabella 2. *Molecole antibiotiche testate: range di concentrazioni testate, break point e fonte bibliografica.*
Table 2. *Antibiotic molecules tested: concentrations range tested, break point and bibliography.*

	BREAK-POINT			**Fonte bibliografica**
Molecola (range di concentrazione testato)	**Sensibile**	**Intermedio**	**Resistente**	
Amoxicillina + Ac.Clavulanico (0,0625-16 µg/mL)	0,25/0,12	0,5/0,25	1/0,5	CLSI V 08
Ampicillina (0,015625-16 µg/mL)	0,5	1	2	CLSI V 08
Ceftiofur (0,0625-8 µg/mL)	2	4	8	CLSI V 08
Enrofloxacin (0, 03125-2 µg/mL)	0,25	0,5	1	CLSI V 08
Florfenicolo (0,25-8 µg/mL)	2	4	8	CLSI V 08
Gamitromicina (2-16 µg/mL)	4	8	16	CLSI V 08
Spectinomicina (4-256 µg/mL)	32	64	128	CLSI V 08
Tetraciclina (0,125-16 µg/mL)	0,5	1	2	CLSI V 08
Tiamulina (8-32 µg/mL)	16	-	32	CLSI V 08
Tildipirosina (2-16 µg/mL)	4	-	8	CLSI V 08
Tilmicosina (0,25-64 µg/mL)	16	-	32	CLSI V 08
Trimetoprim + Sulfonamidi (0,125-16 µg/mL)	2/38	4/76 - 8/152	16/304	CASFM 2019
Tulatromicina (16-128 µg/mL)	16	32	64	CLSI V 08

Tabella 3. *Distribuzione dei ceppi di G parasuis in base alla sensibilità agli antimicrobici nel 2022-2023*
Table 3. *Distribution of G. parasuis strains based on antibiotic susceptibility profile isolated in 2022-2023*

Molecola	**Sensibile**	**Intermedio**	**Resistente**
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	18 (81,8%)	1 (4,5%)	3 (13,6%)
Ampicillina	17 (7,3%)	1 (4,5%)	4 (18,2%)
Ceftiofur	22 (100%)	0	0
Enrofloxacin	16 (72,7%)	0	2 (27,3%)
Florfenicolo	22 (100%)	0	0
Gamitromicina	19 (86,4%)	0	3 (13,6%)
Spectinomicina	22 (100%)	0	0
Tetraciclina	10 (45,5%)	1 (4,5%)	11 (50%)
Tiamulina	22 (100%)	0	0
Tildipirosina	18 (81,8%)	0	4 (18,2%)
Tilmicosina	19 (86,4%)	0	3 (13,6%)
Trimetoprim + Sulfonamidi	14 (63,3%)	4 (18,2%)	4 (18,2%)
Tulatromicina	21 (95,5%)	0	1 (4,5%)

DISCUSSIONE

Nei 10 anni oggetto di questo studio retrospettivo, 130 ceppi di GPS sono stati isolati e sierotipizzati presso la sezione di Reggio Emilia. I ceppi isolati sono stati di più ma, vista la finalità di aggiornare il dato di prevalenza dei diversi sierotipi, sono stati inclusi in questo studio soltanto quelli sottoposti a sierotipizzazione mediante AGID. Infatti oltre alla difficoltà di isolamento del ceppo, per le sue caratteristiche di crescita e l'assenza di terreni selettivi, l'impossibilità di poter ottenere una cultura pura a seguito di trapianto impedisce la valutazione del sierotipo da un lato e della sensibilità agli antimicrobici dall'altro. È importante, a questo scopo, conferire materiale idoneo per l'esame batteriologico, il più fresco e meno contaminato possibile, visto che dati bibliografici attestano come la vera incidenza di infezioni sostenute da GPS sia fino a 10 volte maggiore rispetto a quanto diagnosticato, in parte dovuto proprio all'impossibilità di confermare colturalmente la presenza di GPS dal campione (Miniats et al., 1986). Le metodiche di biologia molecolare come la PCR (tradizionale o Real-Time) possono aumentare l'individuazione di GPS dalle lesioni campionate sebbene, a parte alcuni recenti protocolli, le valutazioni sul sierotipo e sulla sensibilità agli antimicrobici, soprattutto quest'ultima, restano legate all'isolamento batterico. Come già riportato, per la sierotipizzazione eseguita mediante AGID, sono stati valutati i sierotipi 1, 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15, tradizionalmente considerati virulenti (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992) e per i quali il laboratorio ha storicamente prodotto i sieri iperimmuni, derivanti da ceppi isolati da materiale patologico. Il dato di prevalenza osservato deve comunque tenere in considerazione che tra i ceppi definiti NT è possibile siano inclusi ceppi appartenenti ai sierotipi 3, 6, 7, 8, 9, 11 insieme ai ceppi NT propriamente detti. In questo studio il sierotipo 4 risulta essere il prevalente, seguito dal sierotipo 13. Questo dato conferma quanto riportato da Luppi e collaboratori nel 2013, dati che sono stati ottenuti utilizzando la stessa metodica di sierotipizzazione e lo stesso areale geografico d'analisi. Lo studio appena citato mostrava dati di prevalenza simili a quelli ottenuti in altri studi eseguiti in altri Stati, tutti relativi a tipizzazione eseguita con la stessa metodica. Recenti studi, condotti mediante l'utilizzo della PCR per sierotipizzare GPS riportano una maggiore assegnazione dei ceppi NT a determinati sierotipi e mostrano una diversa sieroprevalenza in diversi Stati, sebbene confermino che in Europa il sierotipo 4 sia quello prevalente (Macedo et al., 2021). A livello mondiale questo sierotipo si conferma, insieme ai sierotipi 1, 5/12 e 7 tra i più presenti. Il sierotipo 13, invece, nel contesto mondiale tende ad avere una prevalenza inferiore, ma in uno studio tedesco che prende in considerazione il periodo 2012-2019, si presenta come il secondo sierotipo isolato, dopo il 4, in linea con quanto da noi riportato (Schuwerk et al., 2020). In merito alla correlazione tra sierotipo e sito di isolamento, l'unica associazione considerata statisticamente significativa, nonostante i bassi numeri, è tra il sierotipo 13 e l'isolamento da quadri patologici sistemici come riportato in altri studi sull'argomento (Schuwerk et al., 2020; Luppi et al., 2013; Macedo et al., 2021). Per il sierotipo 4, che nel nostro caso non presenta associazione con uno dei siti di isolamento, dati recenti mostrano una principale associazione con il comparto respiratorio, mentre lo studio italiano del periodo precedente a questo riportava un'associazione con l'isolamento in forma sistemica (Schuwerk et al., 2020; Luppi et al., 2013; Macedo et al., 2021). I risultati relativi alla sensibilità agli antimicrobici mostrano un quadro di diffusa sensibilità, anche verso le molecole comunemente utilizzate per il trattamento della MG. Nello specifico Ceftiofur, Florfenicolo e Tulatromicina si sono dimostrati efficaci su tutti i ceppi testati; per Ampicillina ed Enrofloxacina la percentuale si riduce leggermente attestandosi a 77,3% e 72,7 % rispettivamente. Sebbene queste ultime siano più basse, ma considerato anche il ridotto numero di campioni testati mediante MIC, il dato si presenta in linea con i risultati di antimicrobicosensibilità recentemente presentati

da Cordioli e collaboratori (2023) che si presentavano comparabili a dati ottenuti nel Regno Unito, Danimarca, Spagna e Repubblica Ceca (Aarestrup et al., 2004; Nedbalcova et al., 2006; de la Fuente et al., 2007). I ceppi risultati Resistenti all'Ampicillina hanno mostrato ridotta sensibilità (R o I) anche all'Amoxicillina addizionata con acido clavulanico, facendo registrare comunque verso questa molecola percentuali di sensibilità superiori all'80%. Da segnalare, perché gli unici dati che si discostano dal resto delle molecole, sono la Tetraciclina e il Trimethoprim/Sulfametoxazolo, antibiotici verso il quale rispettivamente solo il 45,4 % e 63,6 % dei ceppi testati è risultato sensibile. Anche in altri studi, queste molecole sono tra le poche a presentare profili di resistenza, sebbene con prevalenza inferiore nella maggior parte dei casi (Cordioli et al., 2023; Wiencek et al., 2022). Si segnala inoltre, a conferma che la selezione di ceppi resistenti derivi da un aumento della pressione selettiva e dunque incoraggiando l'utilizzo di strumenti preventivi, il caso della Tetraciclina in uno studio tedesco dove è stata dimostrata la diminuzione della prevalenza dei ceppi resistenti a queste molecole dopo l'entrata in vigore di leggi che hanno portato alla riduzione dell'uso dell'antimicrobico (Wiencek et al., 2022).

CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di aggiornare la prevalenza dei sierotipi di GPS circolanti in Nord Italia, valutare l'associazione di questi sierotipi a specifiche lesioni macroscopiche osservate e fornire un dato aggiornato di sensibilità agli antimicrobici. La ripartizione tra i diversi sierotipi, in alcuni casi con un numero esiguo di ceppi assegnati, non ha permesso di valutare l'associazione lesione-sierotipo e sebbene con la metodica in uso (che utilizza un gruppo ristretto di antisieri) siano elevati i ceppi considerati NT, la prevalenza osservata è in linea con studi precedenti italiani e recenti simili condotti in Europa. È allineato anche il profilo di sensibilità agli antimicrobici, dato che fornisce informazioni aggiornate su eventuali trattamenti eseguibili quando l'approccio di prevenzione non ha sortito i risultati previsti. In quest'ottica, una metodica più performante, che permetta di assegnare al corretto sierotipo quanti più ceppi possibile, aiuterebbe a valutare nell'implementazione di un approccio preventivo l'utilizzo di vaccini stabulogeni o commerciali alla luce della reale prevalenza in allevamento e/o al grado di cross-protezione tra alcuni sierotipi.

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
2. Angen, Ø., Svensmark, B., & Mittal, K. R. (2004). Serological characterization of Danish Haemophilus parasuis isolates. *Veterinary Microbiology*, *103*(3-4), 255-258.
3. Brockmeier, S. L., Halbur, P. G., & Thacker, E. L. (2002). Porcine respiratory disease complex. *Polymicrobial diseases*, 231-258.
4. 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.
5. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) Reccomandations Vétérinaires 2019
6. Cordioli B., Rizzardi A., Guolo A., Palazzolo L. Garbuio M., Drigo I., Viel L., Bano L. Antimicrobico-sensibilità di ceppi di *Glaesserella parasuis* isolati da suini commerciali dal 2017 al 2022. XLVIII Meeting Annuale SIPAS, Pescantina (VR), 30/31 Marzo 2023. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini 2023, 190-194

7. de la Fuente, A. M., Tucker, A. W., Navas, J., Blanco, M., Morris, S. J., & GutiérrezMartín, C. B. (2007). "Antimicrobial susceptibility patterns of Haemophilus parasuis from pigs in the United Kingdom and Spain". Veterinary microbiology, 120(1-2), 184- 191.
8. Kielstein, P., & Rapp-Gabrielson, V. J. (1992). Designation of 15 serovars of Haemophilus parasuis on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *Journal of clinical microbiology*, *30*(4), 862-865.
9. Luppi, A., Bonilauri, P., Dottori, M., Iodice, G., Gherpelli, Y., Merialdi, G., Maioli, G. & Martelli, P. (2013). Haemophilus parasuis serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, *60*(2), 140-142.
10. Macedo, N., Gottschalk, M., Strutzberg-Minder, K., Van, C. N., Zhang, L., Zou, G., Zhou, R., Marostica, T., Clavijo, M. J., Tucker, A. & Aragon, V. (2021). Molecular characterization of Glaesserella parasuis strains isolated from North America, Europe and Asia by serotyping PCR and LS-PCR. *Veterinary research*, *52*(1), 1-10.
11. Møller, K., Andersen, L. V., Christensen, G., & Kilian, M. (1993). Optimalization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Veterinary Microbiology*, *36*(3-4), 261-271.
12. 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.
13. Oliveira, S., L. Galina, and C. Pijoan, 2001: Development of a PCR test to diagnose Haemophilus parasuis infections. J. Vet. Diagn. Invest. 13, 495–501
14. Olvera, A., Segalés, J., & Aragón, V. (2007). Update on the diagnosis of Haemophilus parasuis infection in pigs and novel genotyping methods. *The Veterinary Journal*, *174*(3), 522-529.
15. Schuwerk, L., Hoeltig, D., Waldmann, K. H., Strutzberg-Minder, K., Valentin-Weigand, P., & Rohde, J. (2020). Serotyping and pathotyping of Glaesserella parasuis isolated 2012–2019 in Germany comparing different PCR-based methods. *Veterinary research*, *51*(1), 1-14.
16. Smart, N. L., Miniats, O. P., Rosendal, S., & Friendship, R. M. (1989). Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with Haemophilus parasuis in swine in southern Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, *30*(4), 339.
17. Wiencek, I., Hartmann, M., Merkel, J., Trittmacher, S., Kreienbrock, L., & Hennig-Pauka, I. (2022). Temporal Patterns of Phenotypic Antimicrobial Resistance and Coinfecting Pathogens in Glaesserella parasuis Strains Isolated from Diseased Swine in Germany from 2006 to 2021. *Pathogens*, *11*(7), 721.

CIRCLES EU PROJECT: RIDUZIONE DELLE EMISSIONI DELL'ALLEVAMENTO DEL NSUINO AAL'INGRASSO ATTRAVERSO IL TRATTAMENTO DEI LIQUAMI IN STALLA CON DIVERSI BIOATTIVATORI

CIRCLES EU PROJECT: ON-FARM WASTEWATER TREATMENT WITH DIFFERENT BIOACTIVATOR REDUCE AIR POLLUTION IN PIG GROWING UNIT

TREVISI P.[1], CORREA F.[1], SECCHI N.[2], GRAZIOSI M.V.[1], VIRDIS S.[1], LUISE D.[1]

[1]*Diparitmento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, 40127 Bologna, Italia;*
[2]*R&D Eurovix S.p.A., 24060 Entratico, Bergamo, Italia.*

Parole chiave: Trattamento dei liquami; Bioattivatori; Emissioni Ammoniaca
Keaywords: Wastewater treatment; Bioactivator, Ammonia emissions

Riassunto
Lo studio ha valutato l'impatto dell'applicazione di bioattivatori batterici-enzimatici nei box, sulle emissioni di gas serra, le caratteristiche dei liquami ed il benessere dei suini durante la fase di magronaggio. 980 suini (47.14 ± 3.82 kg), sono stati assegnati a: i. gruppo di controllo (C), senza trattamento dei liquami; ii. gruppo trattato (TR), che ha ricevuto le seguenti misure per il trattamento dei liquami: 1. Bioattivatore in pastiglia fornita attraverso il grigliato nella vasca dei liquami (1 pastiglia/settimana, ogni 2m³); 2. Bioattivatore in polvere distribuita sul pavimento della vasca dei liquami (1 kg/settimana/10.000 kg); 3. Prodotto liquido disperso tramite un sistema automatico di nebulizzazione nel box. I suini sono stati divisi in quattro box, due box per gruppo, ognuno dotato di e una vasca dei liquami individuale. La sperimentazione è durata 63 giorni. Nel gruppo TR, sono state prelevati campioni di liquame prima di ogni svuotamento (giorni 21, 42, 63) per analisi della qualità e sono state registrate la qualità dell'aria e le lesioni alle orecchie e alle code. Il gruppo TR ha ridotto il pH dei liquami (P=0.03), l'azoto totale (P=0.02), NH_4 (P=0,04) e l'azoto organico (P<0.001), ha aumentato il K_2O totale (P<0.001) e ha ridotto l'NH_3 ambientale (P < 0.001) senza influenzare le lesioni corporee. In conclusione, l'applicazione in azienda dei bioattivatori ha migliorato la qualità dei liquami e mitigato le emissioni di NH_3.

Abstract
The study aimed to investigate the impact of bacterial-enzymatic bioactivator application on greenhouse gas emissions on the farm, characteristics of wastewater, and the welfare of pigs during the fattening phase. 980 pigs (47.14 ± 3.82 kg) were assigned to: i. control group (C), without manure treatment; ii. treated group (TR), which received the following measures for manure treatment: 1. Bioactivator in tablet form provided through the slatted floor in the manure tank (1 tablet/week, every 2m³); 2. Bioactivator in powder distributed on the floor of the manure tank (1 kg/week/10,000 kg of animal weight); 3. Liquid product dispersed through nozzles directly into the pen. Pigs were divided into four pens, two pens per group, each equipped with an individual manure tank. The experiment lasted 63 days. In the TR group, manure samples were taken before each emptying (days 21, 42, 63) for quality analysis, and air quality and ear and tail lesions were recorded. The TR group reduced wastewater pH (P=0.03), total nitrogen (P=0.02), NH_4 (P=0.04), and organic nitrogen (P<0.001), increased total K_2O (P<0.001), and reduced ambient NH_3 (P

< 0.001) without affecting body lesions. In conclusion, on-farm application of bioactivators improves manure quality and mitigates NH_3 emissions.

INTRODUZIONE

L'inquinamento dell'aria derivante dalle attività agricole, in particolare dalla zootecnia, è un tema attuale che concorre a condizionarne la sostenibilità ambientale a causa dei suoi effetti avversi sulla qualità dell'aria, sulla salute umana e sugli ecosistemi. Tra i vari inquinanti, le emissioni di ammoniaca (NH_3) dai liquami suini rappresentano un componente critico, contribuendo alla formazione di particolato e alla eutrofizzazione e acidificazione degli habitat naturali. L'intensificazione della produzione suinicola a livello mondiale ha aggravato il problema, rendendo necessaria l'attuazione di strategie di mitigazione efficaci. Oltre all'ammoniaca, anche metano (CH_4), ossido di azoto (N_2O), biossido di carbonio (CO_2) e idrogeno solforato (H2S) rientrano tra le emissioni dell'allevamento suinicolo. Queste emissioni sono il risultato della combinazione tra i processi digestivi degli animali, e la gestione dei liquami. Inoltre, l'interazione tra questi gas e il particolato aerodisperso (PM10) può influenzare significativamente la qualità dell'aria all'interno e intorno all'allevamento suino, influenzando sia il benessere degli animali che la salute dei lavoratori. Infatti, concentrazione ambientali di NH_3 sopra le 28 ppm rappresentano un fattore di rischio importante per l'insorgenza dei comportamenti aggressivi (Scollo et al., 2016), tra cui la morsicatura della coda (Wathes et al., 2002).

Al fine di ridurre le emissioni dell'allevamento, possono essere applicate diverse tecniche. Queste includono approcci ampiamente utilizzati come la separazione solido-liquido (Hjorth et al., 2010), la rimozione biologica aerobica dell'azoto (Lymperatou et al., 2021; Möller and Müller, 2012). Tuttavia, l'applicazione di questi trattamenti comporta un aumento dei costi div produzione. Un approccio alternativo prevede l'incorporazione di additivi chimici o microbici nel liquame. Questo approccio offre una soluzione più accessibile ed economica. Questi additivi sono progettati per influenzare le proprietà chimiche del liquame attraverso l'inibizione o la stimolazione di processi microbiologici specifici (Sala et al., 2011; Hossain et al., 2021). Ad oggi, i risultati della loro applicazione sono piuttosto variabili, ciò pare essere dovuto alla durata del trattamento ed alla dose di impiego del prodotto.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia della combinazione di diversi bioattivatori batterici-enzimatici applicai nei box di allevamento, sulla riduzione delle emissioni gassose, le caratteristiche dei liquami e il benessere dei suini durante la fase di magronaggio.

MATERIALI E METODI

Un totale di 980 suini, con un peso medio di 47,14±3,82 kg, sono stati assegnati casualmente a uno dei 2 gruppi sperimentali: gruppo di controllo (CTR) e gruppo trattato (TRT). I suini sono stati accasati in 4 box, 2 per ciascun gruppo sperimentale, ciascun box, con dimensioni di 18.40 m x 11.30 m, era dotato di pavimento grigliato, un sistema di ventilazione meccanica e una vasca di raccolta dei liquami separata. La prova ha avuto una durata complessiva di 63 giorni. Nei box TRT, sono stati eseguiti 3 trattamenti:

- Bioattivatore (pastiglie), aggiunto nelle vasche di raccolta dei liquami presenti sotto ai box, attraverso il pavimento grigliato (60 pastiglie per serbatoio 1 volta alla settimana);
- Bioattivatore (polvere), asperso attraverso un nebulizzatore manuale sul pavimento dei box, il giorno prima dell'accasamento dei suini e nei giorni successivi a ogni svuotamento della vasca (1 kg per box alla settimana);
- Bioattivatore liquido (liquido), disperso per mezzo di una pompa automatica munita di quattro nebulizzatori per ogni box TRT, per un totale di 18 minuti al giorno divisi in 36 somministrazioni di 30 secondi ciascuna. Il bioattivatore liquido è stato miscelato ad acqua al 5%, per un totale di un dosaggio di 2,7 litri di soluzione acquosa/giorno

Il bioattivatore in pastiglia (peso di 50g ciascuna), è un prodotto che presenta una componente enzimatica (proteasi, amilasi, lipasi e cellulasi), specie microbiche batteriche e fungine, fattori di crescita microbica naturali. Valore di pH 7,5, umidità < 8%.
Il bioattivatore in polvere è un prodotto che presenta una componente enzimatica (proteasi, amilasi, lipasi e cellulasi), specie microbiche batteriche e fungine, fattori di crescita microbica naturali. Valore di pH 7,0, umidità < 6%.
Il bioattivatore liquido è un prodotto che presenta una componente enzimatica (proteasi, amilasi e cellulasi), aromi ed essenze aromatiche di origine naturale, sali. Valore di pH 6,5, densità 1020 g/l, conducibilità 25 mS/cm.
I 3 bioattivatori impiegati sono esenti da sostanze classificate pericolose per la salute o per l'ambiente ai sensi delle disposizioni del Regolamento (UE) 1272/2008 (CLP) (e successive modifiche ed adeguamenti) in quantità tali da richiederne la dichiarazione.
Le vasche dei liquami sono state per circa ¾ del loro volume ogni 20 giorni. Il giorno prima di ogni svuotamento (giorni 21, 42 e 63 di prova) è stato prelevato un campione di liquami da ciascun serbatoio e rapidamente congelato in ghiaccio secco e quindi conservato a -80°C fino all'analisi in laboratorio.
La qualità dell'aria e i parametri ambientali sono stati registrati nei giorni 0, 21, 42 e 63. In dettaglio, le concentrazioni di CO_2, CO, NH_3, H_2S, O_2, CH_4 sono state valutate utilizzando un rilevatore di gas portatile Dräger X-am® 8000 (Drager, Germania) e l'intensità della luce è stata rilevata da un luxmetro. La qualità dell'aria e i parametri ambientali sono stati registrati sempre al mattino alle 10:30 per tutti i punti temporali e in cinque punti diversi del box (2 nell'angolo sinistro, 2 nell'angolo destro e uno al centro) all'altezza del muso dei suinetti. È stata calcolata una media dei valori per ciascun box.
Le lesioni a coda ed orecchie sono state valutate ai giorni 0, 21, 42 e 63 su un campione di 60 suini per box. Le lesioni alle orecchie e alle code sono state valutate su una scala da 0 a 2 come segue: 0 = assenza di lesioni; 1 = morsi superficiali lungo la lunghezza della coda/dell'orecchio ma senza evidenza di gonfiore o sangue; 2 = sangue fresco visibile sulla coda/sull'orecchio, o presenza di una cicatrice, gonfiore, o una parte mancante della coda/dell'orecchio. La prevalenza di ciascun punteggio è stata calcolata per ciascun box. Successivamente è stato calcolato un indice di punteggio (LSI) per ogni area come segue (intervallo 0-200):

LSI = [prevalenza del punto lesione 1 + (2 * prevalenza del punto lesione 2)].

Analisi dei liquami

La conta microbica totale è stata eseguita sul terreno Plate Count Agar incubazione in piastra petri da 90 mm 28°C per 48h, la conta dei microrganismi anaerobi solfito riduttori è stata eseguita su terreno di coltura Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM) con il metodo MPN incubazione a 37°C per 48h e la conta di lieviti e muffe mediate Potate Dextrose Agar con incubazione in piastra petri da 90 mm, a 30°C per 96h.
Per la caratterizzazione chimica dei liquami sono state eseguite le seguenti analisi con le rispettive metodiche: I. Fosforo totale espresso come P2O5: UNI EN ISO 54321:2021 Met B + UNI EN 16170:2016. II. Potassio (K) come K2O: UNI EN ISO 54321:2021 Met B + UNI EN 16170:2016. III. Sostanze azotate totali: REG. CEE n° 152/09 del 27/01/09 All. III Met. L. IV. Azoto nitrico: Metodo XIV.9 D.M. 13/09/99. V. Azoto organico: IRSA-CNR Q64 Vol.III 6,'85. VI. Azoto totale: UNI EN 16168:2012. VII. Residuo secco a 105°C (sostanza secca): UNI 10780:1998 App C. VIII. Residuo secco a 550°C (ceneri): CNR IRSA 2 Q64 Vol 2 1985.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita in R v4.3.1 (R Core Team, 2021), con i seguenti pacchetti R: car, *emmeans* e *nlme*. I dati sono stati analizzati utilizzando un modello lineare che includeva

l'effetto del Trattamento e del Tempo e la loro interazione (il termine di interazione è stato rimosso quando non significativo). Sono stati eseguiti contrasti pairwise all'interno di ciascun momento in cui il termine di interazione era significativo utilizzando Tuckey HSD. La significatività è stata dichiarata quando $P<0.05$.

RISULTATI

Nella **Tabella 1A** ed **1B** sono riportati i dati riferiti all'effetto dell'intervento sulle caratteristiche dei liquami, comprese BOD5, Umidità, pH, Cenere, Potassio totale (come K_2O), Fosforo totale (come P_2O_5), Azoto totale, Ammoniaca, Azoto nitrico, Azoto organico, Carbonio organico totale, Conteggio batterico totale (CBT) a 28°C, CBT anaerobico per immersione a 37°C, Lieviti e Muffe. Il trattamento ha ridotto significativamente il pH dei liquami ($P = 0.03$), l'Azoto totale ($P = 0,02$), l'Ammoniaca ($P = 0.04$) e l'Azoto organico ($P < 0.001$) e ha aumentato il Potassio totale ($P < 0,001$). Inoltre, è stata registrata una tendenza a ridurre il conteggio di Lieviti e Muffe ($P = 0,07$). È stata rilevata l'interazione tra trattamento e tempo di per il P_2O_5 ($P < 0.01$), il K_2O ($P < 0.01$), la Sostanza secca ($P < 0.01$), le Ceneri ($P < 0.01$), il BOD a 5 giorni ($P < 0.01$) e il COD ($P < 0.01$). In particolare, K_2O, sostanza secca e ceneri erano significativamente più alti al T1 nel TRT rispetto al CTR ($P < 0.05$), mentre il P_2O_5 era significativamente più basso al T1 ($P < 0.05$) e non sono state registrate differenze significative per gli altri momenti temporali. Inoltre, il BOD al giorno 5 e il COD erano significativamente più bassi nel TRT rispetto al CTR al T3 ($P < 0.05$), non sono state osservate differenze per gli altri momenti temporali.

I dati sulla qualità dell'aria sono riportati nella **Tabella 2**. Il trattamento ha ridotto significativamente la concentrazione di NH_3 nell'aria ($P < 0.001$), non sono stati registrati effetti su CO_2, CO e H_2S che sono state riscontrate in entrambe le tesi a concentrazioni relativamente basse.

I dati sull'incidenza di lesioni alle orecchie e alla coda, la mortalità cumulativa e le prestazioni di crescita sono riportati nella **Tabella 3**. Non è stato registrato alcun effetto del trattamento su questi parametri.

DISCUSSIONE

Lo studio ha evidenziato come l'utilizzo della combinazione di diversi Bioattivatori di origine enzimatica e batterica distribuito nel box ha ridotto l'azoto totale nei liquami durante la fase di magronaggio, oltre che la concentrazione ambientale di NH_3, nei box di allevamento.

Nel nostro studio la riduzione della quantità di NH_3 potrebbe essere spiegata dalla riduzione del pH dei liquami dato che la sua volatilità aumenta all'aumentare del pH del liquame. Infatti, l'acidificazione influisce sull'equilibrio dell'azoto ammoniacale totale a favore di NH_4+ piuttosto che di NH_3, limitando di fatto il rilascio di ammoniaca nell'atmosfera (Silva et al., 2022). Inoltre, un altro possibile meccanismo d'azione riguarda la modulazione del microbiota dei liquami. Nel processo di nitrificazione-denitrificazione, alcuni batteri (es. *Nitrosomonas)* consumano e accelerano il passaggio dell'ammoniaca a nitrati durante il primo stadio di ossidazione, poiché intervengono nel processo di nitrificazione, mentre i batteri eterotrofi denitrificanti (*Nitrobacter winogradskyi*) e facoltativi (*Rhodopseudomona palustris*) guidano l'esecuzione della denitrificazione con la conseguente trasformazione dell'azoto in N_2, un gas innocuo.

I risultati ottenuti in questo studio in termini di riduzione dell'ammoniaca sono comparabili a quelli riportati da Liu et al. (2023), dove la strategia impiegata ha previsto la sinergia tra l'acidificazione del liquame suino e l'inibizione dei batteri ureolitici esercitando un effetto significativo sulla mitigazione dell'emissione di ammoniaca. Nel nostro studio, nonostante la significativa riduzione dell'NH_3 questo non ha portato ad una diminuzione dell'incidenze

delle lesioni alle orecchie e alla coda. Questo può essere legato al fatto che anche nel gruppo CTR, i valori di NH_3 registrati (~17 ppm) erano più bassi rispetto a quelli identificati come critici per l'insorgenza della morsicatura della coda (28 ppm) (Scollo et al., 2016).

CONCLUSIONI

In conclusione, l'approccio combinato di bioattivatori enzimatici e batterici distribuiti nei box, ha dimostrato di essere efficace nella riduzione dell'emissione di ammoniaca dai liquami in allevamento, con implicazioni positive per la gestione ambientale e la salute degli animali. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per capire il meccanismo d'azione dei bioattivatori e l'effetto di questi sulle comunità microbiche presenti nei liquami.

BIBLIOGRAFIA

1. Dalmau, A., Velarde, A., Scott, K., Edwards, S., Butterworth, A., Veissier, I., Keeling, L., Overbeke, G., Bedaux, V., (2009). "Welfare Quality® assessment for pigs (sows and piglets, growing and finishing pigs). Lelystad, the Netherlands."
2. Hjorth, M., Christensen, K.V., Christensen, M.L., Sommer, S.G., (2010). "Solid—liquid separation of animal slurry in theory and practice. A review." Agron. Sustain. Dev. 30, 153–180.
3. Hossain, M.Z., Bahar, M.M., Sarkar, B., Donne, S.W., Wade, P., Bolan, N., (2021)."Assessment of the fertilizer potential of biochars produced from slow pyrolysis of biosolid and animal manures". Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 155, 105043. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2021.105043
4. Liu, J., Li, X., Xu, Y., Wu, Y., Wang, R., Zhang, X., Hou, Y., Qu, H., Wang, L., He, M., Kupczok, A., He, J., (2023). "Highly efficient reduction of ammonia emissions from livestock waste by the synergy of novel manure acidification and inhibition of ureolytic bacteria". Environment International 172, 107768.
5. Lymperatou, A., Rasmussen, N.B., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., 2021. "Improving the Anaerobic Digestion of Swine Manure through an Optimized Ammonia Treatment: Process Performance, Digestate and Techno-Economic Aspects". Energies 14, 787. https://doi.org/10.3390/en14030787
6. Möller, K., Müller, T., 2012. "Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review". Engineering in Life Sciences 12, 242–257.
7. Sala V., Gusmara C. Ostanello F, Brignoli P. "Improvement of environmental quality in intensive pig farming through an integrated bioactivation program for the control and prevention of swine mycoplasmal pneumonia." Journal of central European Agriculture, 2011, 12(1), 35-43
8. Scollo, A., Contiero, B., Gottardo, F., (2016). "Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170 kg live weight". The Veterinary Journal 207, 92–98.
9. Silva, A.A., Fangueiro, D., Carvalho, M., (2022). "Slurry Acidification as a Solution to Minimize Ammonia Emissions from the Combined Application of Animal Manure and Synthetic Fertilizer in No-Tillage."Agronomy 12, 265.
10. Wathes, C., Jones, J., Kristensen, H., Jones, E., Webster, A., (2002). A version of pigs and domestic fowl to atmospheric ammonia. Transactions of the ASAE 45.
11. Wheeler, E., Adviento-Borbe, M., Brandt, R., Topper, P., Topper, D., Elliott, H., Graves, R., Hristov, A., Ishler, V., Bruns, M., (2010). "Amendments for mitigation of dairy manure ammonia and greenhouse gas emissions: Preliminary screening", Agricultural Engineering International: CIGR Journal.

Tabella 1A. Effetto del Trattamento sperimentale e del Tempo sulle caratteristiche dei liquami (Batteri totali, Batteri anaerobi solfito-riducenti, Lieviti e Muffe, Azoto nitrico, Azoto organico, Densità di Azoto totale (kg/l), pH e Azoto ammoniacale.
Table 1A. Effect of Experimental Treatment and Time on Wastewater Characteristics (Total Bacteria, Sulfate-reducing Anaerobic Bacteria, Yeasts and Molds, Nitric Nitrogen, Organic Nitrogen, Total Nitrogen Density (kg/l), pH, and Ammoniacal Nitrogen).

Item	CTR	TRT	SEM	P-value	
				Trattamento	Tempo
Conta batterica totale (CFU/g)	4.76E+07	3.56E+07	1.14E+14	0.16	0.004
Conta dei Batteri Anaerobi Solfito-riducenti a 37°C (CFU/g)	8.72E+04	1.14E+05	4.24E+14	0.86	0.004
Lieviti e muffe (CFU/g)	1.30E+05	1.29E+04	4.36E+14	**0.07**	0.1
Azoto Nitrico	0.05	0.05	-	-	-
Azoto Organico (mgN/kg)	1529.5	1160	1635	**<0.001**	0.004
Azoto totale (mgN/kg)	3808	3204	1666	**0.02**	0.001
Densità (kg/l)	1	1.01	0.01	0.28	0.18
pH	6.53	5.75	0.24	**0.03**	0.001
Azoto Ammoniacale (mgN/kg)	2277	2039	77	**0.04**	0.001

Tabella 1B. Effetto del Trattamento sperimentale e del Tempo e la loro interazione sulle caratteristiche dei liquami (Potassio totale (come K2O), Fosforo totale (come P2O5), Materia secca, Cenere, BOD al giorno 5 e COD).
Table 1B. Effect of Experimental Treatment, Time, and Their Interaction on Wastewater Characteristics (Total Potassium (as K2O), Total Phosphorus (as P2O5), Dry Matter, Ash, 5-Day Biochemical Oxygen Demand (BOD), and Chemical Oxygen Demand (COD)).

Item	Tempo						SEM	P-value		
	T1		T2		T3					
	CTR	TRT	CTR	TRT	CTR	TRT		Trattamento	Tempo	Trattamento * tempo
Fosforo (P2O5) (mgP2O5/kg)	334a	774b	801	557	1272a	575b	131	0.029	**<0.001**	**<0.01**
Ossido di Potassio (K2O) (mg/kg)	1509a	2654b	2205	2587	1987	2100	135	**<0.001**	**<0.01**	**<0.01**
Sostanza secca (%)	1.78a	3.27b	2.54	1.97	3.88	2.98	0.35	<0.01	**<0.01**	**<0.01**
Ceneri (%)	0.58a	0.973b	0.615	0.627	0.738	0.588	0.05	**<0.001**	0.1	**<0.001**
Richiesta Biologica di ossigeno a 5 giorni (mgO2/kg)	6150	11650	13250	7600	15475a	6175b	2228	0.09	**0.02**	**0.01**
Richiesta Biologica di ossigeno (mgO2/kg)	18478	34851	40219	22925	46393a	18291b	4735	0.1	**0.02**	**0.01**

Tabella 2. Effetto del Trattamento sperimentale e del Tempo sulla concentrazione di gas ambientali.
Table 2. Effect of Experimental Treatment and Time on Environmental Gas Concentration.

Gas	CTR	TRT	SEM	P-value	
				Treatment	Time
NH3, ppm	17.20	11.70	0.48	**<0.001**	**0.02**
H2S, ppm	0.41	0.38	0.05	0.75	**<0.001**
CO2, vol/%	0.15	0.14	0.01	0.46	0.37
CO, ppm	1.00	0.30	0.29	0.15	0.49

Tabella 3. Effetto del Trattamento sperimentale e del Tempo sull'Indice di Punteggio delle Lesioni (LSI) sulla coda e sull'orecchio, sulla Mortalità e sulle Performance di Crescita.
Table 3. Effect of Experimental Treatment and Time on Lesion Score Index (LSI) on Tail and Ear, Mortality, and Growth Performance.

Item	CTR	TRT	SEM	P-value	
				Trattamento	Tempo
Peso Iniziale, kg	48.90	45.30	2.78	0.45	-
Peso Finale, kg	103.20	97.60	1.84	0.16	-
Incremento Ponderale Giornaliero, g	848.44	817.19	39.53	0.63	-
LSI coda	29.2	26.7	4.25	0.68	<0.001
LSI orecchie	103.3	93.6	12.7	0.60	<0.001
Mortalità cumulativa (%)	3.00	3.67	0.22	0.94	0.36

EFFETTO DEI β-1,3-GLUCANI SUL COLOSTRO, SULLA QUALITÀ DELLA NUTRIZIONE DEI SUINI E SULLA SALUTE IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE IPERPROLIFICHE

EFFECT OF β-1,3-GLUCANS ON COLOSTRUM, PIGLET WEANING QUALITY AND HEALTH IN A HYPERPROLIFIC SOW FARM

NETO R., MATTUZZI S., CASIRO S., BUKOWSKA P, WEALLEANS A., VAN HAMME V.

Kemin Europa n.v., Toekomstlaan 42, 2200 Herentals, Belgium

Parole chiave: Suinetti, colostro, immunoglobuline
***Keywords**:* Piglets, colostrum, immunoglobulins

Riassunto
La qualità del colostro è importante poiché la sua assunzione influisce sulle prestazioni dei suinetti. In questo studio si è valutato l'impatto di un β-1,3-glucano algale (Aleta™, Kemin) sul colostro delle scrofe iperprolifiche, sulla vitalità e sulle prestazioni dei suinetti prima e dopo lo svezzamento.
Lo studio condotto in un allevamento di 1200 scrofe, prevedeva 2 fasi:
1: gruppo di controllo C (n=25) e gruppo BG (n=22 scrofe)
2: gruppo di controllo C (n=87 scrofe) e 3 gruppi BG (da 1 a 3) di 87 scrofe ciascuno.
Entrambi i gruppi hanno ricevuto una dieta base e i BG sono stati integrati con 1 g/scrofa/giorno di β-1,3-glucano dall'85° giorno di gestazione allo svezzamento.
Il colostro è stato raccolto (fase 1) e valutato (IgG e IgA). I suinetti nati vivi (BA), morti (BD), deboli (WP) (<700g) alla nascita, il peso allo svezzamento (WW) e i suini svezzati per scrofa (WPS) sono stati registrati e analizzati in entrambe le fasi. Per la fase 2, sono stati valutati anche la diarrea pre e post-svezzamento, la mortalità e i trattamenti. I dati sono stati analizzati con la funzione Fit Model di JMP 16.
Nella fase 1, sono stati osservati aumenti significativi ($p<0,05$) delle IgA 25,7 e 15,3 (SED=15,3) e delle IgG 114,9 e 74,3 mg/ml (SED 74,3) per BG e C, rispettivamente.
Nella Fase 2, il WW era più alto nei gruppi BG rispetto a C e aumentava da un lotto all'altro, rispettivamente 6,7, 7,2, 7,5 e 7,8 kg per C, BG1, BG2 e BG3 ($P<0,05$).
I risultaticonfermano che il β-1,3-glucano algale migliora la qualità immunologica del colostro, portando a pesi di svezzamento più elevati e ad altri parametri di salute che determinano le prestazioni dei suinetti.

Abstract
Colostrum quality is extremely important as it's intake will determine piglets performance. The objective of this study is to assess the impact of an algal β-1,3-glucan (AletaTM, Kemin) on colostrum of hyperprolific sows, viability, and performance of the piglets pre and post-weaning.

The study was done on a 1200 sow farm and had 2 phases:

1: Control group C (n=25) and BG group (n=22 sows)

2: Control batch C (n=87 sows) and 3 BG batches (1 to 3) of 87 sows each.

Both groups received a basal diet and BG were supplemented with 1 g/sow/day of β-1,3-glucan from 85 days of gestation to weaning.

Colostrum was collected (Phase 1) and assessed (IgG and IgA). Piglets born alive (BA), dead (BD), weak piglets (WP) (<700g) at birth, weaning weight (WW) and weaned pigs per sow (WPS) were recorded and analyzed in both phases. For phase 2, pre and post-weaning diarrhoea, mortality and treatments were also assessed. Data were analysed in the Fit Model function of JMP 16.

In Phase 1, significant increases ($p<0.05$) were observed on IgA 25.7 and 15.3 (SED=15.3) and IgG 114.9 and 74.3 mg/ml (SED 74.3) for BG and C, respectively.

In Phase 2, The WW was higher in the BG groups than in C and increased from batch to batch, 6.7, 7.2, 7.5 and 7.8 kg for C, BG1, BG2 and BG3 respectively ($P<0.05$).

Results of these studies support that algal β-1,3-glucan improves the immunological quality of colostrum, leading to higher weaning weights and other health parameters that determine piglet performance

INTRODUZIONE

Il peso alla nascita dei suinetti (Smith et al. 2007, Fix et al 2010), il peso allo svezzamento e la vitalità possono influire notevolmente sulle prestazioni e sulla salute dei suini per tutta la vita (Collins et al 2017).

È risaputo che i suini più pesanti allo svezzamento hanno prestazioni migliori dopo lo svezzamento (Collins et al. 2017), sono più robusti e consentono anche di seguire diete meno specializzate o per un periodo di tempo più breve, oltre ad accettare meglio le condizioni ambientali dopo lo svezzamento.

È stata posta molta enfasi sul numero di suinetti nati vivi: un numero elevato di suinetti nati vivi è una caratteristica auspicabile, ma in alcune razze si accompagna a un peso alla nascita inferiore, a un aumento della mortalità pre-svezzamento (Calderon Diaz et al 2017) (se non vengono attuate pratiche gestionali specifiche) e a una maggiore competizione per il colostro. Sarebbe utile migliorare la concentrazione di immunoglobuline nel colostro, poiché molte malattie neonatali e dello svezzamento dei suinetti sono correlate ai livelli di immunoglobuline anticorpali di origine materna (E. coli, Clostridium, Streptococcus, ecc.). La salute nelle prime fasi della vita influisce anche sul peso e sulle prestazioni pre-svezzamento.

Lo strumento più conosciuto per aumentare il peso allo svezzamento è senza dubbio l'aumento dell'età di svezzamento: ogni giorno in più porta a un aumento del peso dei suinetti di circa 250 g al giorno. Ciò comporta tuttavia alcuni inconvenienti, come la diminuzione del tasso di parto e altri problemi di gestione della partita.

Gli strumenti in grado di migliorare la qualità del colostro saranno utili in quanto favoriranno la resistenza dei suinetti ad alcune malattie e una migliore crescita pre-svezzamento, con conseguente potenziale riduzione della diarrea e migliori prestazioni post-svezzamento.

Anche la diminuzione del peso dei suinetti e la riduzione della variabilità allo svezzamento sono risultati auspicabili. I β-1,3-glucani hanno dimostrato di essere in grado di migliorare la qualità del colostro, aumentando la concentrazione di IgG e IgA disponibili nel colostro (Neto et al. 2023) o l'ingestione, ma anche la salute dei suinetti dopo lo svezzamento, riducendo la

mortalità dei suinetti (Silva et al. 2023). Se offerti durante la fine della gestazione, i β-1,3-glucani modulano e beneficiano anche l'immunità mediata dalle cellule dei suinetti nati da scrofe che hanno ricevuto β-1,3-glucani.

Aleta™ contiene un β-1,3-glucano altamente biodisponibile proveniente dalle alghe. In risposta al legame con i β-1,3-glucani, le cellule immunitarie diventano più attive e avviano una cascata di segnali che stimola l'attrazione, la formazione e l'attivazione di altre cellule immunitarie e di anticorpi (immunoglobuline). L'obiettivo di questo studio è valutare l'impatto dei β-1,3-glucani delle alghe sulla qualità del colostro delle scrofe iperprolifiche, sulla vitalità e sulle prestazioni dei suinetti nel periodo precedente allo svezzamento e l'impatto dei β-1,3-glucani delle alghe nel periodo successivo allo svezzamento.

MATERIALI E METODI

Per questo studio è stato scelto un allevamento di 1200 scrofe da parto a svezzamento nella Repubblica Ceca. La genetica delle scrofe è Danbred e l'allevamento era negativo alla PRRS e al Mycoplasma hyopneumoniae.

Lo studio è stato suddiviso in due fasi.

- FASE 1: con l'obiettivo di valutare l'impatto di β-1,3-glucani sulla qualità del colostro e il potenziale impatto sulla salute e sulle prestazioni dei suinetti.

- FASE 2: con l'obiettivo di valutare l'impatto di β-1,3-glucani sul peso dei suinetti allo svezzamento, sull'uso di antimicrobici, sulla riduzione del peso dei suinetti allo svezzamento e sulla riduzione della mortalità pre e post-svezzamento.

FASE 1

47 scrofe sono state incluse nello studio. Le scrofe sono state assegnate a uno dei due gruppi, un gruppo di controllo (n=25 scrofe), che ha ricevuto la dieta di base o un gruppo BG (n=22 scrofe) che ha ricevuto la dieta di base integrata con 1 g/scrofa/die di β-1,3-glucani dall'85° giorno di gestazione al parto e anche durante la lattazione con la dieta di lattazione integrata con β-1,3-glucani (1 g/scrofa/die). La FASE 1 è stata affiancata. Un riepilogo del disegno della sperimentazione per la FASE 1 è riportato nella tabella 1.

Tabella 1. Riassunto del disegno del trial dello studio FASE 1
Table 1. Summary of the trial design of PHASE 1 study

Gruppi	Gestazione	Lattazione
Controllo	Dieta base	Dieta base
BG	Dieta base + 1 g / scrofa /giorno β-1,3-glucani da 35 giorni pre-parto	Dieta base + 1 g / scrofa / giorno β-1,3-glucani fino allo svezzamento

Il colostro è stato raccolto dalle scrofe incluse ed è stato valutato per IgG e IgA. Sono state registrate e analizzate le prestazioni della scrofa (numero di suinetti nati vivi, nati morti, numero di suinetti deboli per svezzamento e numero di suinetti svezzati per scrofa per cucciolata).

FASE 2

Per la seconda fase, sono stati inclusi nello studio lotti di parto consecutivi, con un gruppo di controllo (87 scrofe) seguito da tre lotti di 87 scrofe ciascuno, per un totale di 348 scrofe incluse nella FASE 2.

Per la Fase 2, le scrofe hanno ricevuto β-1,3-glucani per tutta la gestazione e la lattazione. La tabella 2 riassume il disegno della sperimentazione

Tabella 2. Riassunto del disegno sperimentale dello studio in FASE 2
Table 2. Summary of the trial design of PHASE 2 study

Gruppi	Gestazione	Lattazione
Controllo	Dieta base	Dieta base
BG	Dieta base + β-1,3-glucani (1g/scrofa/giorno, tutta la gestazione)	Dieta base + β-1,3-glucani (1g/scrofa/giorno in lattazione)

Le scrofe dei gruppi integrati al trattamento, BG1, BG2 e BG3, hanno ricevuto β-1,3-glucani per almeno 30 giorni prima del parto e durante la lattazione.

Durante la FASE 2, sono stati seguiti i seguenti parametri:

- Numero di suinetti nati vivi
- Numero di suinetti nati morti
- Numero di suinetti nati sottopeso (<700g)
- Peso dei suinetti allo svezzamento
- Mortalità pre-svezzamento e causa di morte
- Mortalità post-svezzamento e causa di morte
- Numero di suinetti con diarrea prima e dopo lo svezzamento
- Numero di suinetti trattati e causa dei trattamenti

RISULTATI E DISCUSSIONE

FASE 1

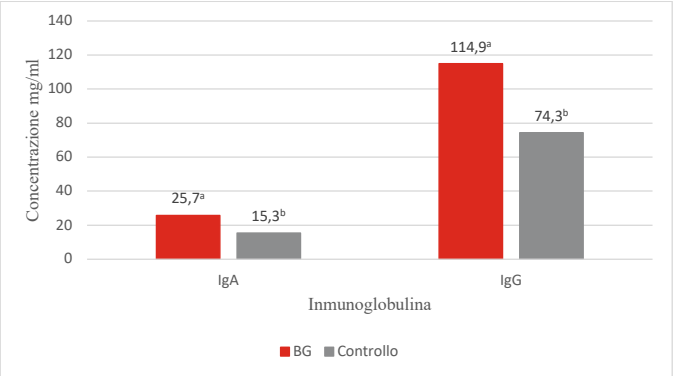
Per la FASE 1, anche se si sono registrati miglioramenti numerici nei parametri di performance delle scrofe quando si sono confrontate le scrofe che hanno ricevuto β-1,3-glucani (gruppo BG) rispetto alle scrofe incluse nel controllo, non sono state osservate differenze significative. Un riepilogo dei parametri di performance delle scrofe per la FASE 1 è riportato nella tabella 3.

Tabella 3. Sintesi affiancata dei risultati delle prestazioni delle scrofe durante la FASE 1.
Table 3. Summary of the Sow performance results during PHASE 1, side by side.

	suinetti nati vivi/ nidiata	**suinetti nati morti/ nidiata**	**suinetti sottopeso/ nidiata**	**Svezzati/ nidiata**
BG	18.9	1.0	1.3	12.7
Controllo	18.7	1.2	1.7	12.4

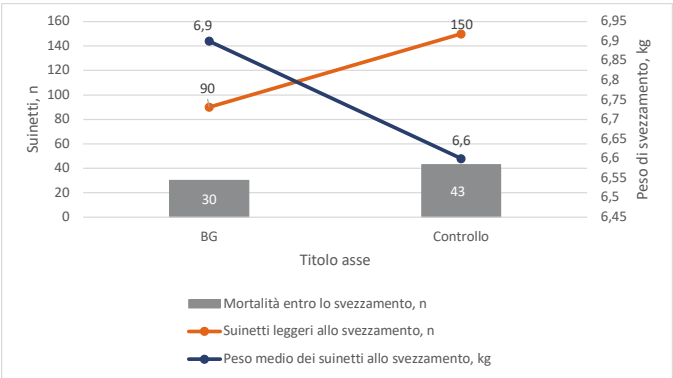
L'analisi dei campioni di colostro delle scrofe incluse nella FASE 1, ha mostrato che, in accordo con studi precedenti, i β-1,3-glucani hanno determinato un aumento significativo della concentrazione di IgA 25,7 mg /ml per il gruppo BG e 15. 3 mg /ml per il gruppo di controllo (SED=15,3, P=0,0012) e di IgG 114,9 mg/ml per il gruppo BG e 74,3 mg/ml per il gruppo di controllo (SED 74,3, P=0,0031). i risultati dell'analisi delle immunoglobuline del colostro (IgA e IgG) sono riportati nella Figura 1.

Figura 1. Risultati dell'analisi del colostro per IgA e IgG. a,b I diversi apici indicano una differenza significativa tra i trattamenti (p<0,05).
Figure 1. Results for the analysis of colostrum for IgA and IgG. a,b Different superscripts indicate a significant difference between treatments (p<0.05)



Per la FASE 1, anche il peso dei suinetti allo svezzamento è aumentato numericamente alla fine dei 29 giorni di lattazione, 6,9 kg per il gruppo BG rispetto al peso medio allo svezzamento dei suinetti del gruppo Controllo, 6,6 kg a 30 giorni di lattazione. Anche il numero di suinetti con basso peso allo svezzamento è stato numericamente inferiore (90 suini e 150 suinetti rispettivamente per il gruppo BG e per il gruppo di controllo). La figura 2 riassume i risultati delle prestazioni fisiche dei suinetti allo svezzamento.

Figura 2. Riepilogo dei pesi e del numero di suinetti leggeri allo svezzamento e della mortalità nel periodo successivo allo svezzamento per il gruppo BG e il gruppo di controllo.
Figure 2. Summary of the weaning weights, number of small piglets and mortality on post-weaning sector for BG and Control group.



FASE 2

Non è stata osservata alcuna differenza significativa nelle prestazioni fisiche delle scrofe al momento del parto; un riepilogo dei risultati del parto dei 4 lotti è riportato nella tabella 4.

Tabella 4. Riepilogo delle prestazioni di parto dei diversi gruppi durante la FASE 2. Gli apici diversi indicano P<0,05
Table 4. Summary of the farrowing performance for the different groups during PHASE 2. Different superscripts indicate P<0.05

	Nati vivi	Nati morti	Basso peso alla nascita (<0.7kg)
BG 1	19.14	0.62	1.45
BG 2	18.72	0.48	1.39
BG 3	18.77	0.62	1.33
Controllo	18.69	0.74	1.69

Il numero di suini svezzati per scrofa e per cucciolata nel gruppo BG 2 è risultato significativamente più basso rispetto al gruppo di controllo e ai gruppi BG 1 e BG 3: 12,6 suinetti per scrofa/ cucciolata per il gruppo BG 2 e 13,0 per il gruppo di controllo, 13,2 e 13,2 per i gruppi BG 1 e BG 3 rispettivamente (P<0,05). Il peso medio della nidiata (kg) allo svezzamento è stato significativamente più alto per tutti i gruppi BG rispetto al Controllo, 97,4 come media per tutti i gruppi BG e 87,5 kg per il gruppo Controllo (P<0,05). Anche il peso medio della cucciolata delle scrofe allo svezzamento nei gruppi BG 1 e BG 2 è risultato significativamente più elevato rispetto a Controllo e BG 2. Ciò ha comportato un aumento significativo del peso medio dei suinetti allo svezzamento. La tabella 5 riassume le prestazioni delle scrofe e della cucciolata allo svezzamento.

Tabella 5. Riepilogo delle prestazioni delle scrofe in fase di svezzamento per i diversi gruppi durante la FASE 2. Apici diversi indicano P<0,05 all'interno dello stesso parametro/colonna.
Table 5. Summary of the weaning sow performance for the different groups during PHASE 2. Different superscripts indicate P<0.05 within the same parameter / column.

	Svezzati/scrofa/ nidiata	Nidiata allo svezzamento (kg)	Peso medio allo svezzamento (kg)
BG 1	13.2 [a]	94.8 [b]	7.2 [c]
BG 2	12.6 [b]	94.7 [b]	7.5 [b]
BG 3	13.2 [a]	102.6 [a]	7.8 [a]
Controllo	13.0 [a]	87.5 [c]	6.7 [d]

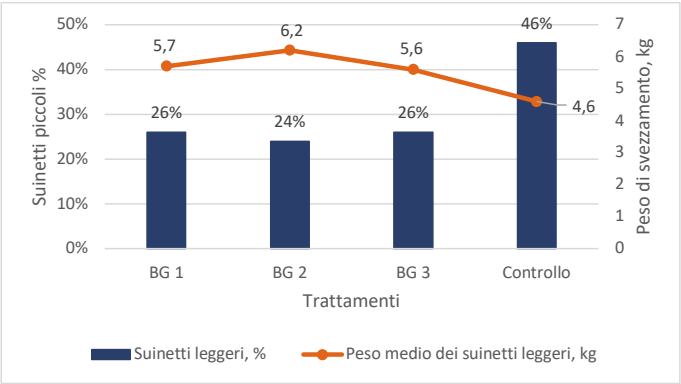
Per valutare la salute dei suinetti pre-svezzamento, possiamo utilizzare la mortalità pre-svezzamento e la percentuale di suinetti trattati. Non è stato possibile calcolare differenze significative, nonostante le differenze numeriche molto importanti dovute alla registrazione dei soli numeri totali. La tabella 6 riassume la mortalità pre-svezzamento e la percentuale di animali trattati.

Tabella 6. Riepilogo dei parametri sanitari pre-svezzamento.
Table 6. Summary of the Pre-weaning health parameters.

	Mortalità pre-svezzamento (%)	Suinetti trattati (%)
BG 1	8.2	19.7%
BG 2	11.1	9.0%
BG 3	7.8	5.7%
Controllo	12.1	20.6%

Per valutare l'impatto dei β-1,3-glucani, nel ridurre l'eterogeneità, possiamo considerare il numero di suinetti di peso ridotto allo svezzamento (leggeri) e il numero di suinetti al di sotto di quello che sarebbe considerato un peso accettabile allo svezzamento. I risultati sono stati molto interessanti e, anche se non è stato possibile effettuare un'analisi statistica, i 4 gruppi presentavano differenze numeriche molto importanti. Tutti i gruppi BG hanno avuto un massimo di suinetti leggeri allo svezzamento pari al 26% del lotto, mentre il gruppo di controllo ha raggiunto il 46% del lotto classificato come leggero; inoltre, il peso medio dei suinetti leggeri è risultato inferiore di almeno 1 kg allo svezzamento, 4,6 kg per il gruppo di controllo e 5,7, 6,2 e 5,6 kg rispettivamente per BG1, BG2 e BG3. Un riepilogo dell'impatto del β-1,3-glucani sui suinetti di peso leggero allo svezzamento è riportato nella Figura 3.

Figura 3. Riepilogo del numero di suinetti leggeri allo svezzamento nei 4 diversi gruppi.
Figure 3. Summary of the number of small piglets at weaning on the 4 different groups.



Per quanto riguarda la valutazione post-svezzamento della FASE 2, dobbiamo notare un'epidemia di diarrea nei suinetti provenienti dalle nidiate delle scrofette. Questo ha colpito soprattutto i gruppi BG 1 e BG 2, con il 25,19% e il 13,06% degli animali con diarrea rispettivamente, mentre lo 0% e l'1,86% dei suinetti nei gruppi BG 3 e Controllo ha avuto la diarrea. Ciò ha comportato un aumento della mortalità nel gruppo BG 2 (3,2%), mentre la mortalità nei gruppi BG1 e BG3 è stata numericamente inferiore rispetto al controllo, rispettivamente 1,65, 1,7 e 2,7. La percentuale di animali trattati rifletteva l'insorgenza della diarrea, con il gruppo BG 3, già non affetto da diarrea, che presentava un numero di animali trattati inferiore rispetto al controllo. La tabella 7 riassume i risultati sanitari post-svezzamento.

Tabella 7. Risultati sanitari post-svezzamento.
Table 7. Post weaning health results.

	Mortalità %	Diarrea %	Animali trattati %
BG 1	1.65%	25.19%	27.68%
BG 2	3.20%	13.06%	25.57%
BG 3	1.70%	0.00%	7.77%
Controllo	2.70%	1.86%	9.36%

CONCLUSIONE

Il colostro è la prima fonte di immunità per i suinetti, ma anche di energia ed è fondamentale per un buon inizio di vita. I miglioramenti del colostro porteranno a una migliore salute dei suinetti, come è stato osservato in questo studio: la progenie delle scrofe che ricevevano il β-1,3-glucani era più sana, con una minore incidenza di diarrea pre-svezzamento, una minore mortalità pre-svezzamento e un peso maggiore dei suinetti allo svezzamento, riducendo il numero di suinetti di peso ridotto allo svezzamento. Questi miglioramenti si sono verificati anche nel periodo successivo allo svezzamento, quando anche in presenza di un'epidemia di diarrea, i gruppi con β-1,3-glucani hanno continuato a registrare una mortalità numericamente inferiore.

Il β-1,3-glucani ha dimostrato che la sua integrazione nella dieta delle scrofe è economicamente valida e si ripagherà con i miglioramenti ottenuti nella qualità dei suinetti allo svezzamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Calderón Díaz Julia Adriana, Boyle Laura Ann, Diana Alessia, Leonard Finola Catherine, Moriarty John Patrick, McElroy Máire Catríona, McGettrick Shane, Kelliher Denis, García Manzanilla Edgar, Early life indicators predict mortality, illness, reduced welfare and carcass characteristics in finisher pigs, Preventive Veterinary Medicine, Volume 146,2017, Pages 94-102,ISSN 0167-5877,https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.07.018.
2. Cherie L. Collins, John R. Pluske, Rebecca S. Morrison, Trevor N. McDonald, Robert J. Smits, David J. Henman, Ingunn Stensland, Frank R. Dunshea, Post-weaning and whole-of-life performance of pigs is determined by live weight at weaning and the complexity of the diet fed after weaning,Animal Nutrition,Volume 3, Issue 4,2017,Pages 372-379,ISSN 2405-6545,https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.01.001.
3. Fix J.S., Cassady J.P., Holl J.W., Herring W.O., Culbertson M.S., See M.T., Effect of piglet birth weight on survival and quality of commercial market swine, Livestock Science, Volume 132, Issues 1–3,2010,Pages 98-106,ISSN 1871-1413,https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.007.
4. Neto R., Bukowska P., Guetta E.N. , Ravichandran S., Wealleans A., Van Hamme V., 34. Effect of an algae β-1,3-glucan on colostrum quality and piglet viability, Animal - science proceedings, Volume 14, Issue 6, 2023, Pages 751-752, ISSN 2772-283X, https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.08.035.
5. Silva J., Silva I. , Soto M., Wealleans A., Neto R., Folque P., Monteiro D., 38 (P3-3). Effect of an algae β-1,3-glucan on piglet pre weaning performance and health, Animal - science proceedings, Volume 14, Issue 6, 2023, Pages 755-756, ISSN 2772-283X, https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.08.039.
6. Smith AL, Stalder KJ, Serenius TV, et al. Effect of piglet birth weight on weights at weaning and 42 days post weaning. *J Swine Health Prod.* 2007;15(4):213–218.

PRINCIPALI ENDOPARASSITI DEI SUINI DA INGRASSO E FATTORI DI RISCHIO ASSOCIATI IN NORD ITALIA

MAJOR ENDOPARASITES OF FATTENING PIGS AND ASSOCIATED RISK FACTORS IN NORTHERN ITALY

ALLIEVI C., VALLERI M., ZANZANI S.A., ZANON A., MORTARINO M., MANFREDI M.T.

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università degli Studi di Milano, Via dell'Università, 6, 26900 Lodi, Italia

Parole chiave: suini; sito di ingrasso; endoparassiti
Keywords: pigs; fattening unit; endoparasites

Riassunto
In Italia l'allevamento suinicolo è principalmente caratterizzato da allevamenti intensivi in cui le malattie parassitarie presentano spesso un quadro subclinico, pur causando una diminuzione del benessere animale e ingenti perdite economiche. Il presente studio indaga lo stato di parassitismo gastrointestinale nei suini da ingrasso mediante l'analisi di 880 campioni fecali da 22 allevamenti situati nel nord Italia. Per l'analisi dei campioni è stata utilizzata una tecnica copromicroscopica quali-quantitativa e per l'identificazione di uova di cestodi è stata eseguita una PCR convenzionale. Sono stati anche raccolti dati relativi alla gestione aziendale per valutare i fattori di rischio eventualmente associati alla presenza di infezioni parassitarie. Un totale di 95 campioni (10,8%) è risultato positivo per almeno un taxon parassitario; il parassita più rilevato è stato *Ascaris suum* (7,6%) (UPG max = 4900), seguito da *Trichuris suis* (1,7%) (UPG max = 186) e *Cystoisospora suis* (0,9%) (OPG max = 460). In 16 campioni (1,8%) sono state trovate uova con caratteristiche morfometriche riconducibili a quelle di *Hymenolepis diminuta*, cestode specifico dei micromammiferi, e l'analisi molecolare ha confermato una completa omologia. Questo studio fornisce dati aggiornati sulla prevalenza dei parassiti nei suini dimostrando la loro persistenza, seppur con basse prevalenze, e la necessità di adottare misure specifiche per ridurre gli effetti sulla salute e sulla produttività degli animali.

Abstract
Pig farming in Italy is mainly characterised by intensive systems, in which parasitic diseases often present a subclinical development, while causing a decrease in animal welfare and huge economic losses. The present study aims to record the prevalence of the main gastrointestinal parasites in fattening pigs by analysing 880 faecal samples from 22 farms located in northern Italy. A quali-quantitative copromicroscopic technique was used to analyse the samples and a conventional PCR was performed to identify cestode eggs. Moreover, farm management data were collected to assess risk factors possibly associated with parasite occurrence. A total of 95 samples (10.8%) were positive for at least one parasite taxon; *Ascaris suum* was the most detected parasite (7.6%) (EPG max = 4900), followed by *Trichuris suis* (1.7%) (EPG max = 186) and *Cystoisospora suis* (0.9%) (OPG max = 460). In addition, eggs with morphometric features compatible with those of *Hymenolepis diminuta*, a specific cestode of small mammals, were detected in 16 samples (1.8%) and the molecular analysis confirmed a complete homology. This study provides current data on the circulation of gastrointestinal parasites in fattening pigs, demonstrating their persistence, although with low prevalences, and the need for specific measures to control their effects on animal health and herd productivity.

INTRODUZIONE

In Italia le aziende suinicole si concentrano nelle regioni settentrionali, dove si alleva la maggior parte del patrimonio suinicolo nazionale con un sistema di tipo intensivo. L'aumento di questa tipologia di allevamento ha favorito un importante miglioramento delle pratiche di igiene e biosicurezza, grazie alla loro applicabilità su larga scala. È stato infatti dimostrato che il controllo dell'ingresso di persone e veicoli nell'allevamento, la limitazione dell'accesso di animali selvatici e la pulizia dei recinti, così come l'applicazione di vaccinazioni contro specifiche malattie e l'esecuzione di esami parassitologici delle feci, possono promuovere sostanziali benefici economici (Laanen et al. 2013; Stygar et al. 2020; Pettersson et al. 2021a). I parassiti dei suini sono comuni in tutti i sistemi produttivi; in particolare, quelli con un ciclo di vita diretto, caratterizzati da elementi parassitari longevi e fortemente resistenti, possono facilmente diffondersi anche nell'allevamento di tipo intensivo. In questo contesto le infezioni parassitarie hanno spesso un andamento subclinico, con conseguente minore attenzione nei loro confronti da parte di allevatori e veterinari, e sono raramente incluse come agenti causali o contribuenti nella diagnosi differenziale dei disturbi gastrointestinali. Tuttavia, i parassiti possono essere responsabili di diarrea, enterite e vomito, predisponendo ad altre malattie e causando una riduzione del tasso di crescita e della conversione alimentare, un'alterazione della distribuzione del grasso e lo scarto degli organi parassitati al macello, con un forte impatto sulla produttività dell'ospite (Kipper et al. 2011; Roepstorff et al. 2011). Un altro aspetto importante è che alcuni parassiti rappresentano un rischio di infezione per i professionisti coinvolti nella catena alimentare (ad esempio, allevatori e veterinari) per il loro potenziale zoonotico, sia per contatto diretto che per esposizione ad ambienti contaminati (Nejsum et al. 2012). A livello aziendale diversi fattori possono influenzare la presenza di parassiti, come il tipo di pavimentazione, la presenza di accesso all'esterno, l'uso di lettiere e l'utilizzo del sistema tutto pieno/tutto vuoto (Joachim et al. 2001; Kochanowski et al. 2017). Inoltre, la mancanza di protocolli standardizzati per l'applicazione dei farmaci antiparassitari ha portato a un loro frequente utilizzo metafilattico, senza alternanza con diversi principi attivi, che può aumentare la selezione di alleli di resistenza nella popolazione parassitaria e ridurre il benessere degli animali, dal momento che le concentrazioni sub-terapeutiche di antielmintici consentono a un maggior numero di parassiti di sopravvivere al trattamento (Macrelli et al. 2019; Hinney et al. 2020).

MATERIALI E METODI

Campionamento e raccolta dati

Lo studio è stato condotto in 22 allevamenti di suini da ingrasso situati in diverse regioni italiane, 18 in Lombardia, 3 in Piemonte e 1 in Emilia-Romagna (Figura 1). Tutti gli allevamenti erano di tipo intensivo, in cui i suini venivano accasati all'età di tre mesi, con un peso compreso tra 30 e 50 kg, e macellati all'età di nove mesi, con un peso compreso tra 160 e 180 kg. Il campionamento è stato effettuato da luglio 2022 a ottobre 2023 e, complessivamente, sono stati campionati 880 suini in due diverse sessioni: al tempo 1 (T1), ovvero all'inizio del periodo di ingrasso, e al tempo 2 (T2), appena prima della macellazione. In ogni allevamento sono stati raccolti in maniera randomica da diversi box 20 campioni fecali direttamente dall'ampolla rettale per evitare contaminazioni (440 campioni al T1 e 440 al T2).

Gli animali campionati erano apparentemente sani, senza segni clinici riconducibili alla presenza di parassiti gastrointestinali. Dopo la raccolta, i campioni sono stati posti in contenitori di plastica, etichettati e trasferiti in laboratorio refrigerati a +4 °C. Due aliquote di ciascun campione sono state conservate a -20 °C per le successive analisi molecolari. I

dati riguardanti la gestione dell'allevamento, tra cui le dimensioni dell'azienda (<1900 animali, ≥1900 animali), il tipo di pavimentazione (pieno, grigliato, misto), l'accesso all'esterno (sì/no), l'applicazione del sistema tutto pieno/tutto vuoto (sì/no) e l'applicazione del trattamento antiparassitario (sì/no) sono stati raccolti intervistando l'allevatore.

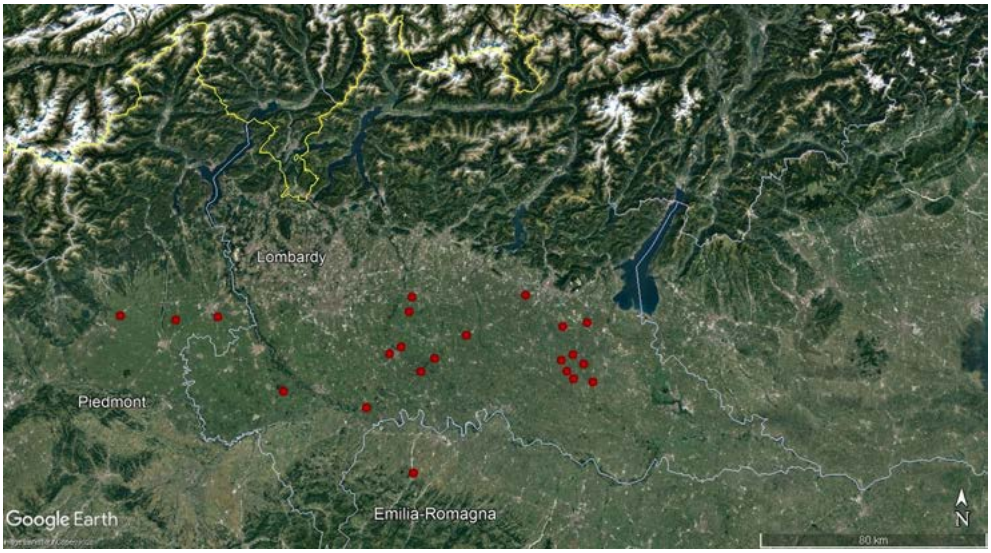


Figura 1. Distribuzione spaziale degli allevamenti di suini da ingrasso selezionati nell'Italia settentrionale utilizzando Google Earth Pro (versione 7.3). Legenda: linee azzurre = confini regionali italiani, punti rossi = allevamenti suinicoli.
Figure 1. Spatial distribution of selected fattening pig farms in northern Italy using Google Earth Pro (version 7.3). Legend: light blue lines = Italian regional boundaries, red dots = pig farms.

Analisi copromicroscopica
L'analisi copromicroscopica è stata effettuata nei due giorni successivi alla raccolta mediante una tecnica di flottazione quali-quantitativa. Per ogni campione è stata utilizzata la tecnica FLOTAC, caratterizzata da una sensibilità analitica di due uova/oocisti/larve per grammo (UPG/OPG/LPG) di feci (Cringoli et al. 2010). Tutti i campioni sono stati analizzati utilizzando due diverse soluzioni di flottazione, rispettivamente FS2 (cloruro di sodio, NaCl; p.s. = 1200) e FS7 (solfato di zinco, ZnSO4; p.s. = 1350). Le UPG/OPG sono state calcolate per tutti i nematodi e i coccidi rilevati, mentre l'infezione da cestodi è stata valutata solo mediante analisi qualitativa.
Per i coccidi, l'isolamento e la successiva identificazione delle oocisti sporulate sono stati effettuati utilizzando la soluzione di Sheater a base di sale e zucchero (p.s. = 1290) (Harleman & Meyer 1984; Joachim et al. 2018).

Analisi molecolare
Per identificare le uova di cestodi il DNA genomico è stato estratto da circa 200 mg di feci risultate positive con la tecnica FLOTAC usando un kit commerciale (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germania).
È stata quindi eseguita una PCR convenzionale che, utilizzando primer universali, amplificava le sequenze nucleotidiche di una regione di 471 bp del gene mitocondriale NADH deidrogenasi 1 (Bowles e McManus 1993). Le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 50

µL, contenente 5 µL di DreamTaq 10X con 20 mM di MgCl2 (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Italia), 5 µL di miscela di dNTP 2 mM (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Italia), 1 µM di ciascun primer (JB11-5' AGATTCGTAAGGCCTAATA-3', JB12 5'-ACCACTAACTAATTCACTTTC-3'), 1. 25 U di DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Italia), 31,75 µL di acqua (Sigma-Aldrich, Italia) e 5 µL di campioni di DNA. Le reazioni di PCR sono state eseguite in un termociclatore (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler, Waltham, MA, USA). La reazione è stata eseguita con una fase iniziale di denaturazione a 95 °C per 3 minuti, seguita da 10 cicli di denaturazione (30 secondi a 95 °C), annealing (35 secondi a 50 °C) ed estensione (30 s a 72 °C), seguiti da 30 cicli di denaturazione (30 s a 95 °C), annealing (35 s a 48 °C) ed estensione (30 s a 72 °C) e da una fase finale di estensione (7 minuti a 72 °C). I controlli positivi e negativi sono stati inclusi nella corsa. I prodotti della PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1,5% contenente bromuro di etidio allo 0,05% in un buffer TBE per elettroforesi e visualizzati sotto luce ultravioletta su un transilluminatore utilizzando un ladder di DNA da 500 bp come standard dimensionale (GeneRuler, Thermo Fisher Sc (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Italia). Le bande della dimensione prevista sono state estratte dal gel di agarosio e purificate con un kit commerciale (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, Düren, Germania). I prodotti di PCR purificati sono stati poi inviati per il sequenziamento bidirezionale a un servizio commerciale (Microsynth Seqlab, Göttingen, Germania). Le sequenze sono state confrontate con le sequenze nucleotidiche disponibili nel database GenBank utilizzando il programma BLASTN e poi allineate tra loro utilizzando il software Mega6 (Tamura et al. 2013).

Analisi statistica

Lo stato di ciascun allevamento e di ciascun animale (infetto o non infetto) per gli elminti (*Ascaris suum*, *Trichuris suis*, Hymenolepididae) e i coccidi è stato determinato mediante l'analisi copromicroscopica. L'analisi statistica è stata condotta solo sui campioni raccolti nella seconda sessione di campionamento (T2) e i valori di prevalenza di ciascun parassita sono stati associati alle caratteristiche gestionali delle aziende. Quindi, i dati di gestione dell'allevamento (dimensioni, tipo di pavimentazione, accesso all'esterno, applicazione del sistema tutto pieno/tutto vuoto, applicazione del trattamento antiparassitario) sono stati valutati come fattori di rischio per la comparsa dei parassiti e introdotti in modelli misti lineari generalizzati (GLMM) come variabili indipendenti, mentre lo stato di positività/negatività ai parassiti è stato introdotto come variabile dipendente. L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS (versione 28.0.1.1, Chicago, IL, USA).

RISULTATI

Analisi copromicroscopica

Su 880 campioni fecali individuali, 95 (10,8%) hanno mostrato positività ad almeno un taxon di parassiti, mentre a livello aziendale è stata registrata una prevalenza di 63,6% (14/22 aziende positive) (Tabella 1). Complessivamente, *A. suum* è stato il parassita più frequentemente rilevato, in particolar modo, dieci aziende su 22 (45,4%) e 67 suini su 880 (7,6%) sono risultati positivi (Tabella 1). *T. suis* è stato riscontrato in sei aziende su 22 (27,3%) e in 15 suini su 880 (1,7%), mentre le uova di Strongylida e le larve di nematodi broncopolmonari non sono state rilevate in nessun campione. Tutte le oocisti di coccidi sono state classificate come appartenenti a *Cystoisospora suis*, mentre il genere *Eimeria* spp. non è stato rinvenuto. Le oocisti di *C. suis* sono state sporadicamente trovate in entrambe le sessioni di campionamento, con una prevalenza aziendale di 13,6% e con otto campioni positivi su 880 (0,9%). Infine, uova di cestodi appartenenti alla famiglia Hymenolepididae, con caratteristiche morfometriche compatibili con quelle di *Hymenolepis diminuta*, sono state evidenziate in 16 campioni su 880 (1,8%).

Tabella 1. Prevalenza di parassiti gastrointestinali negli allevamenti di suini da ingrasso del Nord Italia.
Table 1. Prevalence of gastrointestinal parasites in fattening pig farms in northern Italy.

Parassiti rilevati	Aziende positive		Campioni positivi	
	N°	Prevalenza % (95% CI)	N°	Prevalenza% (95% CI)
Ascaris suum	10/22	45,4 (24,4-67,8)	67/880	7,6 (5,9-9,6)
Cystoisospora suis	3/22	13,6 (3,1-35,1)	8/880	0,9 (0,3-1,8)
Trichuris suis	6/22	27,3 (10,7-50,2)	15/880	1,7 (1-2,8)
Hymenolepididae	6/22	27,3 (10,7-50,2)	16/880	1,8 (1-2,9)
Totale	**14/22**	**63,6 (40,7-82,8)**	**95/880**	**10,8 (8,8-13)**

Coinfezioni e risultati quantitativi
Le coinfezioni sono state osservate in 11 campioni su 880 (1,2%) e le associazioni più comuni sono state tra *A. suum* e *T. suis* (5/880) e tra *A. suum* e *H. diminuta* (5/880), mentre solo un campione è risultato positivo sia per *A. suum* che per *C. suis*.
Per quanto riguarda le cariche parassitarie nei campioni positivi, la conta delle uova fecali di *A. suum* è variata da 4 UPG nella prima sessione di campionamento (T1) a 4900 UPG al T2. Per quanto riguarda *T. suis*, il picco di escrezione è stato di 186 UPG nella seconda sessione di campionamento, mentre quello di *C. suis* era di 460 OPG nella prima sessione di campionamento. Le distribuzioni di UPG/OPG fecali in ciascuna sessione di campionamento (T1 e T2) sono riportate nella Figura 2.

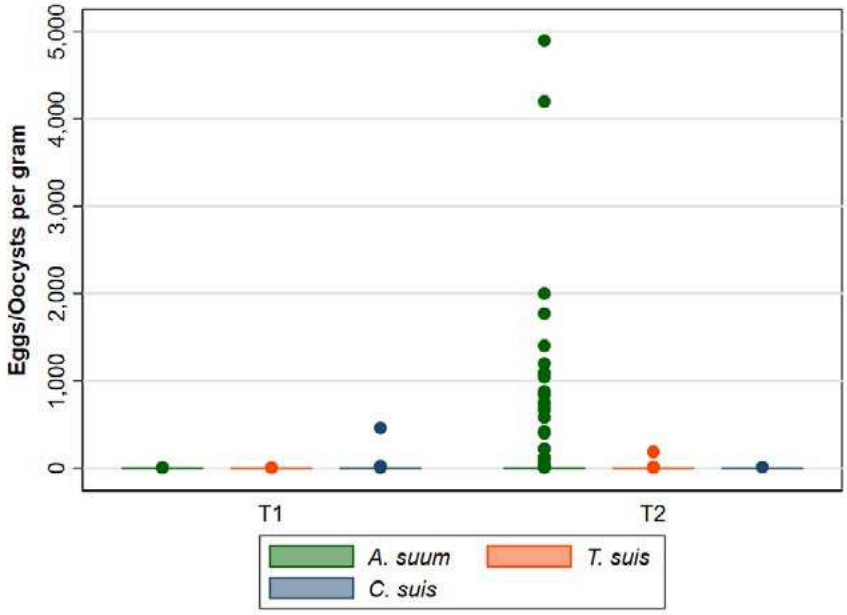


Figura 2. Distribuzione delle UPG/OPG fecali dei parassiti rilevati nei campioni positivi in T1 e T2.
Figure 2. Distribution of faecal EPG/OPG of detected parasites in positive samples according to T1 and T2.

Analisi molecolare
L'estrazione di DNA e la PCR convenzionale sono state eseguite su 16 campioni che erano positivi alle uova di cestode all'esame copromicroscopico. Tutti i campioni sono risultati positivi al DNA di cestode e dei 16 ampliconi individuati, tutti sono stati sequenziati mostrando un'omologia del 100% con *H. diminuta*.

Fattori di rischio
La maggior parte degli allevamenti applicava il sistema tutto pieno/tutto vuoto (16/22) e trattava i suini con antielmintici (benzimidazoli) dopo l'accasamento nel sito di ingrasso (18/22). L'accesso all'esterno era equamente distribuito nelle due categorie (sì/no); mentre per il tipo di pavimentazione, 12 allevamenti avevano un pavimento pieno, due pavimento misto (pieno + grigliato) e otto pavimento grigliato. I dati raccolti in ciascuna azienda sono stati considerati come possibili fattori di rischio per l'insorgenza dei parassiti e sono stati introdotti in modelli misti lineari generalizzati (GLMM). I GLMM finali sono riportati nella Tabella 2: le aziende di grandi dimensioni e quelle che applicavano il sistema tutto pieno/tutto vuoto sono state associate a un minor rischio di infezioni da *A. suum*. Per quanto riguarda *C. suis*, *H. diminuta* e *T. suis*, non sono stati evidenziati predittori significativi per le infezioni.

Tabella 2. GLMM finali dei fattori di rischio risultati come predittori significativi di infezione.
Table 2. Final GLMM of risk factors found to be significant predictors of infection.

Parassiti rilevati	Variabile	Categoria	Odds ratio (95% CI)	p-value
A. suum	Tutto pieno/ tutto vuoto	No	34 (1-1132)	0,048*
		Sì (rif.)	1	
	Dimensione azienda	Grande ((≥1900 animali)	0,01 (0,03-0,2)	0,032*
		Piccola (<1900 animali) (rif.)	1	

DISCUSSIONE
I valori di prevalenza registrati in questo studio sono risultati modesti, anche se l'utilizzo di un metodo diagnostico di tipo quantitativo, caratterizzato da un'elevata sensibilità, ha permesso di rilevare uova/oocisti anche in caso di bassa escrezione (Cringoli et al. 2010). *A. suum* è stato il parassita più rilevato: 67 suini su 880 sono risultati positivi, con una prevalenza di 7,6%, simile a quella riportata in altri Paesi europei, che variava da 0,9% a 9% (Kochanowski et al. 2017; Symeonidou et al. 2020; Pettersson et al. 2021b). Sebbene i soggetti eliminatori di uova siano pochi, il dato quantitativo dimostra che tali animali hanno una grande capacità escretrice, responsabile del mantenimento della contaminazione a livello ambientale e della conseguente infezione di altri suini. Ne consegue l'importanza, nel contesto suinicolo analizzato, di monitorare le infezioni gastrointestinali con una metodica copromicroscopica quantitativa e altamente sensibile, come quella utilizzata nel presente studio. L'esame copromicroscopico potrebbe non identificare i soggetti positivi se l'infezione è allo stadio di prepatenza ma al macello potrebbero essere rinvenute le tipiche lesioni "milk spots". Infatti, l'infezione da *A. suum*, anche quando si presenta in forma subclinica, è responsabile di significative perdite economiche principalmente legate allo scarto dei fegati parassitati, ma anche alla riduzione dell'incremento ponderale giornaliero, alla diminuzione dell'efficienza di conversione alimentare e alla minore qualità della carne (Boes et al. 2010; Massaglia et al. 2018).
L'aumento delle positività e delle cariche nella seconda sessione di campionamento potrebbe

essere legato sia al lungo periodo di prepatenza di *A. suum* che alla persistenza di stadi infettivi resistenti dal ciclo precedente, che potrebbero aver favorito l'infezione dopo l'entrata nelle unità di ingrasso (Roepstorff et al. 2011; Symeonidou et al. 2020). Inoltre, la somministrazione di un unico trattamento antielmintico dopo l'accasamento, come si è verificato nella maggior parte degli allevamenti campionati, non garantisce la protezione dall'infezione, considerando che gli stadi larvali in migrazione potrebbero sfuggire al trattamento e la somministrazione del farmaco potrebbe essere stata effettuata prima dell'eventuale infezione (Joachim et al. 2001). L'analisi statistica ha dimostrato che due variabili erano associate a un rischio inferiore di infezione da *A. suum*; in particolare, le aziende di grandi dimensioni e quelle che applicavano il sistema tutto pieno/tutto vuoto presentavano un rischio inferiore. A tal proposito, diversi studi hanno evidenziato che la gestione dell'allevamento potrebbe influenzare notevolmente la presenza di ascaridi a livello aziendale; la numerosità giocherebbe un ruolo centrale in quanto le condizioni igieniche potrebbero essere meno adeguate e i sistemi di biosicurezza meno organizzati nelle realtà di piccole dimensioni rispetto a quelle di grandi dimensioni (Kochanowski et al. 2017; Pettersson et al. 2021a). Inoltre, l'applicazione di un sistema tutto pieno/tutto vuoto consentirebbe il lavaggio sistematico, la decontaminazione e l'asciugatura tra i lotti, riducendo la pressione parassitaria e la resistenza ambientale delle uova (Martínez-Pérez et al. 2017; Delsart et al. 2022).

Per quanto riguarda *T. suis*, è stata registrata una prevalenza di 1,7% e valori comparabili, compresi tra 0% e 1,4%, sono stati descritti anche in altri Paesi europei (Kochanowski et al. 2017; Symeonidou et al. 2020; Pettersson et al. 2021b). In generale, la presenza di *T. suis* negli allevamenti intensivi è sporadica dal momento che si tratta di un parassita caratterizzato da un lungo periodo di prepatenza e può non essere rilevato al momento dell'analisi copromicroscopica (Symeonidou et al. 2020). Inoltre, la gestione aziendale potrebbe influenzare la prevalenza; infatti, sono stati riportati tassi di positività più elevati in allevamenti di tipo non intensivo, caratterizzati da un accesso prolungato al pascolo (Delsart et al. 2022).

Le infezioni da coccidi della specie *C. suis* sono state trovate in tre allevamenti e otto campioni. Vale la pena notare che in un allevamento la circolazione di *C. suis* è stata dimostrata in entrambe le sessioni di campionamento, probabilmente a seguito della contaminazione persistente dei box, causata dalla resistenza delle oocisti ai comuni prodotti chimici disinfettanti (Straberg & Daugschies 2007). Al contrario, negli altri due allevamenti positivi, le oocisti sono state rilevate solo nella prima sessione di campionamento, quando, considerata la giovane età dei soggetti, la probabilità di infezione è maggiore (Pettersson et al. 2021b).

Infine, la presenza di uova di *H. diminuta* è interessante considerando che questo cestode zoonotico non era mai stato segnalato nei suini. Il rilevamento di queste uova potrebbe essere un caso di pseudo-parassitismo in seguito all'ingestione accidentale di carcasse o feci di roditori infetti, che rappresentano l'ospite definitivo del ciclo del parassita (d'Ovidio et al. 2015). Un'altra opzione plausibile è che si tratti di un caso di parassitismo attivo, per l'ingestione di ospiti intermedi del ciclo parassitario, ossia insetti che ospitano larve di cisticercoidi. Seguendo questa ipotesi, i suini potrebbero rappresentare un nuovo ospite definitivo, insieme ai roditori, all'uomo e ad altri primati non umani (Panti-May et al. 2020). A sostegno di ciò, un recente studio ha evidenziato la presenza di adulti di *H. diminuta* nell'intestino di cinghiali, sebbene questo dato non fosse associato alla presenza di uova del cestode all'analisi copromicroscopica (Lahmar et al. 2019). Alcuni studi hanno anche riportato la presenza di cestodi specifici del suino, appartenenti al genere *Hymenolepis* e filogeneticamente vicini a *H. diminuta*; tuttavia, per confermare la possibile inclusione dei suini tra gli ospiti definitivi del ciclo parassitario sono necessarie ulteriori indagini (Jia et al. 2016; Zhao et al. 2016).

CONCLUSIONI

I dati raccolti in questo studio hanno fornito il quadro attuale dello stato parassitario nei suini da ingrasso in un'area dell'Italia settentrionale caratterizzata da un'elevata densità di allevamenti di tipo intensivo. Le infezioni da parassiti gastrointestinali sono state riscontrate nella maggior parte degli allevamenti campionati con basse prevalenze ma elevati valori di escrezione, evidenziando la capacità dei parassiti di persistere per tutto il periodo di ingrasso. Risulta, quindi, necessario implementare le misure di controllo agendo sui fattori di rischio legati alla gestione aziendale, ad esempio, promuovendo il sistema tutto pieno/tutto vuoto e sviluppando un approccio integrato che includa adeguati piani di trattamento antiparassitario e l'analisi routinaria delle feci per la ricerca di parassiti con metodiche quantitative altamente sensibili. I risultati ottenuti in questa indagine suggeriscono anche la necessità di condurre ulteriori studi sull'effettivo impatto dei parassiti sulla salute degli animali e sulla produttività dell'allevamento. Nuovi approfondimenti dovrebbero riguardare *H. diminuta*, considerando che questo cestode non era mai stato rilevato nei suini.

BIBLIOGRAFIA

1. Boes J., Kanora A., Havn K.T., Christiansen S., Vestergaard-Nielsen K., Jacobs J., Alban L. (2010) Effect of *Ascaris suum* infection on performance of fattening pigs. Vet Parasitol 172, 269-276.
2. Bowles J., McManus D.P. (1993) NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. Int J Parasitol 23, 969-972.
3. Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J. (2010) FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nat Protoc 5, 503-515.
4. Delsart M., Fablet C., Rose N., Répérant J.M., Blaga R., Dufour B., Pol F. (2022) Descriptive epidemiology of the main internal parasites on alternative pig farms in France. J Parasitol 108, 306-321.
5. d'Ovidio D., Noviello E., Pepe P., Del Prete L., Cringoli G., Rinaldi L. (2015) Survey of *Hymenolepis* spp. in pet rodents in Italy. Parasitol Res 114, 4381-4384.
6. Harleman J.H., Meyer R.C. (1984) Life cycle of *Isospora suis* in gnotobiotic and conventionalised piglets. Vet Parasitol 17, 27-39.
7. Hinney B., Cvjetković V., Espigares D., Vanhara J., Waehner C., Ruttkowski B., Selista R., Sperling D., Joachim A. (2020) *Cystoisospora suis* control in Europe is not always effective. Front Vet Sci 7, 113.
8. Jia Y.Q., Yan W.C., Du S.Z., Song J.K., Zhao W., Zhao Y.X., Cheng W.Y., Zhao G.H. (2016) *Pseudanoplocephala crawfordi* is a member of genus *Hymenolepis* based on phylogenetic analysis using ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal 27, 1688-1692.
9. Joachim A., Dülmer N., Daugschies A., Roepstorff A. (2001) Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. Vet Parasitol 96, 135-146.
10. Joachim A., Ruttkowski B., Sperling D. (2018) Detection of *Cystoisospora suis* in faeces of suckling piglets – when and how? A comparison of methods. Porcine Health Manag 4, 20.
11. Kipper M., Andretta I., Gonzalez Monteiro S., Lovatto P.A., Lehnen C.R. (2011) Meta-analysis of the effects of endoparasites on pig performance. Vet Parasitol 181, 316-320.
12. Kochanowski M., Karamon J., Dąbrowska J., Dors A., Czyżewska-Dors E., Cencek T. (2017) Occurrence of intestinal parasites in pigs in Poland - the influence of factors related to the production system. J Vet Res 61, 459-466.

13. 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. Vet J 198, 508-512.
14. Lahmar S., Torgerson P.R., Mhemmed H., Tizaoui L., Mhadhbi N., Bani A., Driss H., Ghrissi N., Makhzoumi M., Houidi A.B., Dhibi M., Said Y., Pozio E., Boufana B. (2019) Cystic echinococcosis and other helminth infections of wild boar in northeastern and northwestern regions of Tunisia. Parasitology 146, 1263-1274.
15. Macrelli M., Williamson S., Mitchell S., Pearson R., Andrews L., Morrison A.A., Nevel M., Smith R., Bartley D.J. (2019) First detection of ivermectin resistance in *Oesophagostomum dentatum* in pigs. Vet Parasitol 270, 1-6.
16. Martínez-Pérez J.M., Vandekerckhove E., Vlaminck J., Geldhof P., Martínez-Valladares M. (2017) Serological detection of *Ascaris suum* at fattening pig farms is linked with performance and management indices. Vet Parasitol 248, 33-38.
17. Massaglia S., Merlino V.M., Borra D., Verduna T., Renna M., Rambozzi L. (2018) Impact of swine ascariasis on feeding costs and revenues in farms associated with the Italian PDOs dry-cured hams industry. Qual - Access Success 19, 146-154.
18. Nejsum P., Betson M., Bendall R.P., Thamsborg S.M., Stothard J.R. (2012) Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. J Helminthol 86, 148-55.
19. Panti-May J.A., Rodríguez-Vivas R.I., Luis García-Prieto L., Servián A., Costa F. (2020) Worldwide overview of human infections with *Hymenolepis diminuta*. Parasitol Res 119, 1997-2004.
20. Pettersson E., Sjölund M., Wallgren T., Osterman L.E., Höglund J., Wallgren P. (2021a) Management practices related to the control of gastrointestinal parasites on Swedish pig farms. Porcine Health Manag 7, 12.
21. Pettersson E., Sjölund M., Dórea F.C., Lind E.O., Grandi G., Jacobson M., Höglund J., Wallgren P. (2021b) Gastrointestinal parasites in Swedish pigs: Prevalence and associated risk factors for infection in herds where animal welfare standards are improved. Vet Parasitol 295, 109459.
22. Roepstorff A., Mejer H., Nejsum P., Thamsborg S.M. (2011) Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. Vet Parasitol 180, 72-81.
23. Straberg E., Daugschies A. (2007) Control of piglet coccidiosis by chemical disinfection with a cresol-based product (Neopredisan 135-1®). Parasitol Res 101, 599-604.
24. Stygar A.H., Chantziaras I., Toppari I., Maes D., Niemi J.K. (2020) High biosecurity and welfare standards in fattening pig farms are associated with reduced antimicrobial use. Animal 14, 2178-2186.
25. Symeonidou I., Tassis P., Gelasakis A.I., Tzika E.D., Papadopoulos E. (2020) Prevalence and risk factors of intestinal parasite infections in greek swine farrow-to-finish farms. Pathogens 9, 556.
26. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30, 2725-2729.
27. Zhao G.H., Wang H.B., Jia Y.Q., Zhao W., Hu X.F., Yu S.K., Liu G.H. (2016) The complete mitochondrial genome of *Pseudanoplocephala crawfordi* and a comparison with closely related cestode species. J Helminthol 90, 588-595.

CASO CLINICO: EPISODI DI ACTINOBACILLOSI DA *ACTINOBACILLUS SUIS* IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DA INGRASSO IN PROVINCIA DI RAVENNA

[1]PERULLI S.[1], FIORENTINI L.[1], LUPPI A.[4], SICLARI C.[1], TATTINI A.[2], CIRASELLA L.[1], TADDEI R.[3], TOSI G.[1]

[1]*IZSLER*, Forlì, Italy.
[2]*Veterinario libero professionista*.
[3]I*ZSLER* Bologna, Italy
[4]I*ZSLER* Parma, Italy.

INTRODUZIONE

Lo scopo del presente lavoro è quello di descrivere un caso clinico di Actinobacillosi da *Actinobacillus suis* verificatosi in un allevamento di suini da ingrasso situato nella provincia di Ravenna.

L' esame anatomopatologico eseguito su quattro suini lattoni morti rapidamente con sintomatologia non patognomonica, ha permesso di evidenziare lesioni sistemiche, con la presenza di aree necrotiche con aspetto a "carta geografica" a livello epatico e di emorragie polmonari diffuse, edema polmonare e consolidamento del parenchima.

La diagnosi è stata confermata attraverso l'esame batteriologico che ha permesso l'isolamento da fegato, polmoni, milza, reni e linfonodi di un ceppo di *Actinobacillus suis,* confermando la diffusione sistemica del batterio.

Actinobacillus suis è un cocco-bacillo Gram-negativo aerobio facoltativo, importante patogeno opportunistico che può causare malattie nei suini di tutte le età, soprattutto negli allevamenti con elevato stato sanitario (Wilson e McOrist, 2000). Colonizza il tratto respiratorio superiore all'inizio del periodo neonatale e spesso risiede in modo asintomatico nelle tonsille palatine (Sanford, 1992). *A. suis* può provocare una pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica molto simile a quella causata da *Actinobacillus pleuropneumoniae*; tuttavia, a differenza di quest'ultimo, *A. suis* può anche causare enterite, mastite, metrite, aborto e una serie di forme invasive tra cui artrite, meningite e setticemia fatale (MacInnes e Desrosiers, 1999).

Actinobacillus suis cresce facilmente su agar sangue, formando colonie piccole (1 -2 mm), grigiastre, traslucide che producono un'ampia zona di beta emolisi; può essere differenziato da altri batteri correlati per la sua capacità di produrre catalasi, ossidasi e per idrolizzare l'esculina a differenza dell'*Actinobacillus pleuropneumonia* (APP) che è esculina negativo (Yaeger 1996).

A. suis condivide molti fattori di virulenza con *A. pleuropneumoniae* e altri batteri Gram-negativi, come la capsula e il lipopolisaccaride (Van Ostaaijen et al., 1997).

Questo microrganismo ha geni che codificano per tossine molto simili ad ApxI e ApxII di *A. pleuropneumoniae* che contribuiscono alla virulenza di questo batterio e potrebbero essere in parte responsabili, della protezione crociata osservata contro l'infezione da APP (Macinnes et al., 2008).

La maggior parte degli isolati di *A. suis* sono sensibili a un'ampia gamma di antibiotici tra cui ampicillina, ossitetraciclina e streptomicina, ma la rapida insorgenza può rendere difficile il trattamento (Sanford, 1992).

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico oggetto di questo lavoro si è verificato in un sito 3, di circa 1800 capi, di un

allevamento multi-sito della provincia di Ravenna, caratterizzato da un sito 1 in provincia di Treviso di alto livello sanitario, PRRS free, e da sito 2 situato in provincia di Parma, anch'esso con alti standard sanitari.
Nelle prime 3 settimane dall'accasamento sono stati registrati rari casi di mortalità nel sito 3 (5 suini su 1800).

Tra gennaio e febbraio 2024, sono state conferite al nostro laboratorio 3 carcasse di suini di circa 30 kg di peso, sottoposti a esame necroscopico con metodiche standardizzate e visceri (fegato e milza) di un altro soggetto deceduto.
L'esame anatomopatologico eseguito durante la necroscopia evidenziava uno stato di nutrizione ed apparato muscolo scheletrico nella norma. All' apertura della cavità addominale si osservavano: in 3 soggetti aree di necrosi epatica "a carta geografica" e in un soggetto lesioni ascessuali disseminate nel parenchima epatico; la milza si presentava aumentata di volume e congesta nella maggior parte degli animali, in un suino si evidenziava iperplasia della polpa bianca; si rilevava inoltre: peritonite fibrinosa e aderenze tra anse intestinali in un soggetto ed enterite emorragica con linfoadenomegalia ed emorragie dei linfonodi meseraici in un altro animale.
In cavità toracica si evidenziavano lesioni polmonari a diverso stadio evolutivo; in alcuni animali si osservava edema, emorragie polmonari, aumento di consistenza del parenchima ed aree di epatizzazione rossa, in un suino esiti di pleuropolmonite fibrinosa e pericardite fibrinosa.

Figura 1 ***Figura 2***

Fig.1: lesioni ascessuali epatiche
Fig.1: hepatic granulomatous lesions
Fig.2: edema, emorragie polmonari ed epatizzazione rossa del parenchima polmonare
Fig.2: edema, pulmonary hemorrhages and red hepatization of the lung parenchyma

Le diagnosi differenziali considerate comprendevano forme sistemiche sostenute da *Streptococcus suis*, pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica da *Actinobacillus pleuropneumoniae* e infezioni da *Glaesserella parasuis* (agente eziologico della malattia di Glässer).

Da tutte le carcasse conferite sono stati prelevati campioni di organi (fegato, rene, milza, polmone e linfonodi) e sottoposti ad esame colturale diretto su terreni solidi (agar sangue, hektoen enteric agar e agar lievito-siero). Il microrganismo è stato isolato su agar sangue, sul quale formava delle colonie grigie traslucide con un alone marcato di emolisi; il ceppo è stato inviato presso il laboratorio della sede IZSLER di Bologna per l'identificazione mediante spettrometria di massa (MALDI-TOF) grazie alla quale è stato identificato come *A. suis.*
Dai campioni di fegato e milza di un soggetto è stato effettuato l'esame isto-patologico che ha evidenziato le seguenti lesioni: iperplasia follicolare della milza, epatite suppurativa batterica con edema e dissociazione delle filiere epatiche e multifocali infiltrati di granulociti neutrofili ed elementi linfocitari talvolta a circondare emboli batterici

Gli esami diagnostici effettuati e i risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 1.

Esame diagnostico	**Campione**	**Metodo**	**Risultati**
Esame colturale	Fegato, rene e milza	Semina su agar sangue, hektoen incubati a 37°C per 24 ore in aerobiosi	Positivo per colonie grigie traslucide ed emolitiche su agar sangue
	Polmone	Semina diretta su agar sangue, hektoen e agar lievito-siero incubati a 37°C per 24 ore in aerobiosi	Positivo per colonie grigie traslucide ed emolitiche su agar sangue e colonie biancastre su agar lievito-siero
Identificazione microrganismo MALDI-TOF	Isolato batterico su agar sangue	Spettrometria di massa	*Actinobacillus suis*
Esame Istologico	Fegato e milza	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni con formalina al 10%	Epatite suppurativa batterica, iperplasia follicolare della milza
Ricerca influenza di tipo A	Polmone	PCR real time	Negativo
Ricerca *Glaesserella parasuis*	Polmone	PCR	Negativo
Ricerca Peste Suina Africana	Milza	PCR real time	Negativo
Ricerca PRRS	Polmone	PCR real time	Negativo
Ricerca *Brachyspira* spp.	Contenuto intestinale	Tecnica microbiologica	Negativo

Tabella 1: esami diagnostici effettuati e risultati
Table 1: diagnostic investigation and results

È stata inoltre testata la suscettibilità del ceppo batterico isolato agli antibiotici mediante tecnica di diffusione in agar (Kirby-Bauer) in accordo con i parametri interpretativi indicati nei documenti: CLSI VET01(2018), CSLI VET08 (2018) e CSLI M100 (2019). I risultati del test sono riassunti in Tabella 2.

Sensibile	Resistente
Ac. nalidixico	Ampicillina
Amoxicillina + Ac. Clavulanico	Tilmicosina
Ceftiofur	Tilosina
Enrofloxacin	
Florfenicolo	
Gamitromicina	
Kanamicina	
Spectinomicina	
Tetraciclina	
Trimetoprim + Sulfamidico	
Tulatromicina	

Tabella 2: risultati del test di suscettibilità agli antibiotici
Table 2: results of antibiotic sensitivity test

DISCUSSIONE

Il caso clinico oggetto del presente lavoro riguarda episodi di mortalità avvenuti in suini lattoni provenienti da un allevamento da ingrasso della provincia di Ravenna, causati da infezione sostenuta da *A. suis*.

L'actinobacillosi sostenuta da questo microrganismo non sono di frequente riscontro soprattutto se confrontate a quelle causate dal più diffuso *A. pleuropneumoniae*, principale responsabile della pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica del suino.

A.suis viene considerato un patogeno opportunista, i quadri clinici sostenuti da questo microrganismo sono piuttosto variabili; si passa da infezioni asintomatiche a patologie con decorso molto rapido, che portano a morte l'animale colpito in poco tempo, tanto da rendere inutile qualsiasi trattamento farmacologico (Sanford, 1992).

Dall'esame anatomopatologico e colturale effettuato su organi e carcasse conferite presso il nostro laboratorio abbiamo potuto riscontrare come la patologia, seppur di insorgenza respiratoria, a differenza di *A. pleuropneumonie*, mostri una diffusione sistemica causando, nel caso qui descritto, gravi lesioni a livello epatico, confermate anche dall'esame isto-patologico.

È interessante notare come nel caso in oggetto, si riscontrasse l'alto livello sanitario sia dell'allevamento di nascita (sito 1) che di quello di svezzamento (sito 2), considerato dalla bibliografia sull'argomento (Wilson e McOrist, 2000), come fattore predisponente.

È molto probabile pertanto che l'infezione sia avvenuta nel suinetto lattante nel quale, come è noto, il patogeno si localizza a livello delle tonsille palatine (Sanford, 1992); tale ipotesi è sostenuta dal fatto che il primo soggetto conferito al nostro laboratorio è deceduto due giorni dopo il trasferimento nell'allevamento da ingrasso.

Un altro fattore che potrebbe aver causato l'insorgenza della patologia è lo stress dovuto ad un momentaneo sovraffollamento nel sito 2, dovuto ad un ritardo nello spostamento degli animali a causa delle limitazioni alle movimentazioni conseguenti all'emergenza della Peste Suina Africana.

Dall'analisi di questo caso clinico è stato possibile valutare l'evoluzione delle lesioni polmonari causate da *A. suis*, da forme emorragico-edematose a epatizzazione rossa fino a pleuropolmoniti fibrino-necrotico-emorragiche nelle infezioni prolungate.

È consigliabile pertanto tenere in considerazione *A. suis* in forme di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica e in forme sistemiche, in particolare in allevamenti con alti standard sanitari, dove verosimilmente l'assenza di altri patogeni competitivi e scarsa immunità protettiva, favoriscono la moltiplicazione e l'espressione del patogeno.

BIBLIOGRAFIA

1. Michael J. Yaeger J (1996) "An outbreak of *Actinobacillus suis* septicemia in grow/finish pigs" Vet Diagn Invest 8:381 -383
2. MacInnes, J.I., Desrosiers, R., 1999. Agents of the "Suis-ide" diseases of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. Can. J. Vet. Res. 63, 83–89.
3. MacInnes, J. I., Gottschalk, M., Lone, A. G., Metcalf, D. S., Ojha, S., Rosendal, T., ... & Friendship, R. M. (2008). Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus suis, Haemophilus parasuis, Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. Canadian Journal of Veterinary Research, 72 (3), 242.
4. Van Ostaaijen, J., Frey, J., Rosendal, S., & MacInnes, J. I. (1997). *Actinobacillus suis* strains isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry apxICABDvar. suis and apxIICAvar. suis toxin genes. Journal of Clinical Microbiology, 35(5), 1131-1137
5. Wilson, R.J., McOrist, S., 2000. *Actinobacillus suis* infection in pigs in Australia. Aust. Vet. J. 78, 317–319.
6. Sanford, S. E. 1992. *Actinobacillus suis*, p 633–437. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. d'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), Diseases of swine, 7th ed. Iowa State University Press, Ames.

AGGIORNAMENTO SULLA PREVALENZA DEI VIROTIPI ISOLATI IN FOCOLAI DI COLIBACILLOSI ENTERICA POST SVEZZAMENTO IN ITALIA

UPDATE ON THE PREVALENCE OF THE VIROTYPES ISOLATED FROM POST-WEANING ENTERIC COLIBACILLOSIS OUBREAKS IN ITALY

TORREGGIANI C., PROSPERI A., CHIAPPONI C., MANFREDI R., BAIONI L., PUPILLO G., DE LORENZI G., RUGNA G., BASSI P., TONNI M., MAISANO A. M., LUPPI A.

Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, IZS-LER

Parole chiave: ETEC, Fattori di virulenza, Colibacillosi enterica post-svezzamento
Keywords: ETEC, Virulence factors, Post-weaning enteric colibacillosis

Riassunto
Nel presente studio si riporta un aggiornamento della prevalenza dei diversi virotipi di *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC), isolati negli anni 2022-2023 da 701 focolai di diarrea post svezzamento (PWD), diagnosticati in altrettante aziende suinicole italiane. La diagnosi di colibacillosi enterica è stata confermata dall'esame batteriologico eseguito da tamponi rettali e contenuto intestinale di suini con forma clinica acuta. I ceppi sono stati genotipizzati impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine (tossine termostabili, STa e STb, tossina termolabile, LT e tossina Stx2e). Tutti i ceppi di *E. coli* isolati erano emolitici su Agar sangue e la prevalenza delle fimbrie e tossine rilevate tra i ceppi inclusi nello studio è risultata essere: F18 (69,5%), F4 (31,1%), STa (95,0%), STb (94,15%), LT (19,40%). Il virotipo isolato più frequentemente è stato F18 STa STb (60,34%), seguito da F4 STa STb e F4 STa STb LT osservati rispettivamente nel 14,40% e 13,12% dei casi.

Abstract
The aim of this study was to update the prevalence of fimbriae and toxins among enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) isolated from post weaning diarrhoea PWD-affected piglets from 701 outbreaks of (PWD) occurred in as many pig farms in Italy during 2022-2023. The diagnosis of enteric colibacillosis was confirmed by bacteriological examination from rectal swabs and luminal contents from acutely affected pigs. Strains were genotyped using a multiplex end-point PCR method for genes coding for F4, F5, F6, F18, F41 and for toxins (thermostable toxins, STa and STb, thermolabile toxin, LT and Shiga-like toxin, Stx2e). All 701 *E. coli* strains isolated were haemolytic on blood Agar and among the strains included in the study the prevalence of fimbriae and toxins were: F18 (69,5%), F4 (31,1%), STa (95,0%), STb (94,15%), LT (19,40%). The most frequently isolated virotype was F18 STa STb (60,34%), followed by F4 STa STb (14,40%) and F4 STa STb LT (13,12%).

INTRODUZIONE

La diarrea post-svezzamento (PWD) è senza dubbio una delle maggiori problematiche nell'allevamento suinicolo a livello mondiale, è caratterizzata da incremento della mortalità, diminuzione dell'incremento ponderale e dall'aumento dei costi di gestione derivanti dalla necessità di trattamenti antibiotici (Vangroenweghe et al, 2020).
Come conseguenza dell'infezione da *Escherichia coli* enterotossigeni ETEC nei casi di PWD, si sviluppa diarrea da lieve a grave, generalmente entro pochi giorni dallo svezzamento, che si associa a disidratazione e aumento della mortalità.

Gli ETEC rappresentano una delle principali cause di diarrea post-svezzamento e sono caratterizzati dalla presenza di fimbrie che mediano l'adesione del batterio a recettori presenti sull'orletto a spazzola degli enterociti dei villi intestinali e da enterotossine termostabili (STa e STb) e termolabili (LT, ulteriormente suddivise in LT1 e LT2), che alterano l'omeostasi del piccolo intestino causando un'ipersecrezione di elettroliti e di conseguenza di liquidi nel lume intestinale e determinando la caratteristica diarrea secretoria descritta nella PWD.

L'adesione e la conseguente colonizzazione intestinale di ceppi ETEC, nel periodo post svezzamento, dipendono da recettori intestinali specifici per le fimbrie F4 o F18, essenziali perché si verifichi la malattia. Anche se con frequenti eccezioni, i ceppi ETEC F4 sono correlati a PWD nei primi giorni successivi allo svezzamento, mentre quelli F18 sono responsabili di casi di colibacillosi più frequentemente tra 5 e 14 giorni post svezzamento (Fairbrother and Nadeau, 2019), con casi descritti fino a 6 settimane dopo lo svezzamento (Garcia et al., 2020). L'espressione dei recettori F4 e F18 nel piccolo intestino è età dipendente. Per questo motivo le infezioni da ETEC F4 si riscontrano immediatamente dopo lo svezzamento così come nel periodo neonatale, mentre l'infezione da ETEC F18 si osserva esclusivamente nel periodo post-svezzamento (Garcia et al., 2020).
I ceppi ETEC F4 e F18 presentano diverse varianti classificate sulla base di caratteristiche antigeniche. Per F4 sono state descritte le varianti ab, ac, ad; mentre per F18 sono state descritte due varianti ab e ac.
La combinazione dei diversi fattori di virulenza, rappresentati da fimbrie e tossine, determina il virotipo.
La circolazione dei diversi virotipi di ETEC responsabili dei casi di colibacillosi enterica in una determinata area geografica o sistema produttivo, è una condizione mutevole, che può subire forti variazioni nel corso del tempo (Luppi et al., 2014).
Lo scopo di questo studio è quello di aggiornare il dato di prevalenza dei diversi virotipi di ETEC responsabili di focolai di PWD in Italia negli anni 2022-2023.

MATERIALI E METODI

Nel corso del 2022 e 2023 sono stati isolati presso l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, 701 ceppi ETEC da altrettanti focolai di PWD osservati in aziende suinicole italiane. Tali ceppi sono stati isolati da materiale patologico costituito da contenuto intestinale e tamponi rettali, prelevati da suini con un quadro clinico riferibile a colibacillosi enterica, insorti circa 1-3 settimane post svezzamento. I tamponi rettali o il contenuto degli intestini sono stati seminati con metodiche routinarie utilizzando terreno Agar sangue e Gassner agar. Questi sono stati incubati a 37°C in ambiente aerobio e dopo 18-24 ore d'incubazione è stata eseguita una valutazione sia morfologica che quantitativa delle colonie isolate. È stata inoltre valutata la presenza di emolisi su Agar sangue, infatti, a tale proposito, occorre sottolineare che la maggior parte degli ETEC isolati da casi di diarrea post-svezzamento sono emolitici quando coltivati su terreni a base di sangue. Per la diagnosi di colibacillosi la crescita batterica è stata considerata significativa quando presente in coltura pura oppure quando la percentuale delle colonie di *E. coli* patogeno erano ≥70%. Successivamente alla valutazione morfologica, per ogni ceppo di *E. coli*, è stata eseguita la genotipizzazione impiegando una metodica multiplex end-point PCR che identifica i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine STa, STb, LT e Stx2e (Casey and Bosworth, 2009). I ceppi sono stati classificati come ETEC se in possesso di almeno un gene codificante per le fimbrie ed uno per le tossine. Quando all'interno dello stesso focolaio sono stati ottenuti ceppi appartenenti allo stesso virotipo, questo è stato conteggiato come unico isolato nel calcolo della prevalenza.

RISULTATI

Tutti i ceppi (701) di *E. coli* isolati erano emolitici su terreno Agar sangue. La prevalenza delle fimbrie e delle tossine era distribuita come segue: F18 (69,5%), F4 (31,1%), STa (95,00%), STb (94,15%), LT (19,40%).

I risultati della genotipizzazione hanno evidenziato che il virotipo F18 STa STb è risultato essere il frequente, ovvero nel 60,34% dei casi, seguito da F4 STa STb e F4 STa STb LT (14,40% e 13,12% dei casi rispettivamente) (Tabella 1).

VIROTIPO	%
F18 STa STb	**60,34**
F4 STa STb	**14,40**
F4 STa STb LT	**13,12**
F18 STa	**4,99**
F4 STb LT	**2,28**
F18 STb LT	**1,28**
F18 STb	**0,71**
F4 LT	**0,57**
F18 STa STb LT	**0,42**
F4 STa STb LT F18	**0,42**
F18 STa LT	**0,14**
F4 STa	**0,14**
F18 LT	**0,14**
F18 STa LT	**0,14**

Tabella 1. Frequenza dei diversi virotipi ETEC isolati.
Table 1. ETEC virotypes prevalence.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio ha voluto indagare la prevalenza dei virotipi di ETEC isolati da 701 focolai di colibacillosi enterica nel periodo post-svezzamento in Italia negli anni 2022-2023. Il dato che emerge riguarda la prevalenza dei ceppi F18 che risultano essere i principali responsabili, in termini d frequenza, delle forme di colibacillosi nel periodo post-svezzamento, e che il virotipo prevalente è F18 STa STb, seguito da F4 STa STb e F4 STa STb LT.

Paragonando i dati italiani emersi da questo studio con studi di prevalenza effettuati in anni precedenti, in particolare negli anni 2019 e 2020, si conferma la prevalenza dei ceppi ETEC F18, che risultano in aumento rispetto al dato precedente (Torreggiani et al., 2021).

Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti dallo studio spagnolo di García-Meniño e colleghi del 2021 nel quale gli autori riportano che il 43,5% dei ceppi *E. coli* isolati da suini con diarrea in Spagna tra il 2005 e il 2017 erano F18 e il 38,2% erano F4; dati simili sono riportati nello studio Coreano di Do e colleghi del 2020 nel quale emerge che da 118 *E. coli* isolati da suini con diarrea post-svezzamento in Korea tra il 2016 e il 2017, il 40,7% era F18 e il 16,9% era F4.

In studi precedenti, ETEC F4 risultavano essere nettamente prevalenti rispetto agli ETEC F18 (Luppi et al., 2014).

Questa netta inversione di tendenza è particolarmente evidente se si mettono a confronto i dati emersi nel presente studio e i dati dello studio sopraccitato di Luppi e colleghi del 2014 nel quale si riporta che ETEC F4 risultava essere responsabile dell'89.2% dei casi di colibacillosi post-svezzamento in allevamenti italiani.

A livello europeo, in paesi come Belgio ed Olanda si riportano dati di prevalenza differenti, infatti, uno studio di Vangroenweghe del 2020 riporta che le fimbrie riscontrate più

frequentemente erano F4 (43.1%), seguite da F18 (39.0%), mentre il virotipo isolato più frequentemente era F18 STa STb (18.5%), seguito da F4 STa STb LT (15.2%), F4 STa STb (14.9%), F4 STb LT (8.7%) e infine F4 LT (8.0%). In entrambi i paesi la prevalenza di ETEC F4 era significativamente più elevata se paragonata a ETEC F18, tuttavia con differenze in riduzione rispetto a studi precedenti (Vangroenweghe et al, 2020).
In un recente studio Danese, gli autori riportano che il numero di ceppi F4 e F18 isolato da casi PWD era sovrapponibile (Garcia et al, 2020).
Analizzando questi studi emerge la tendenza all'aumento di ceppi ETEC F18 rispetto a ceppi ETEC F4 e, altresì, la variabilità della prevalenza dei virotipi ETEC in focolai di colibacillosi enterica nei diversi Paesi europei ma anche nel corso del tempo. Questa inversione della prevalenza tra F4 e F18 potrebbe rappresentare l'evoluzione nel tempo di questi due tipi fimbriali che può essere stata determinata da differenti concause**.** Tra i fattori da considerare come responsabili di queste variazioni sono sicuramente molto importanti quelli legati all'ospite, come ad esempio, specifiche caratteristiche genetiche che modulano la presenza di recettori, per le fimbrie degli ETEC, a livello intestinale. É noto da molti anni come la genetica degli animali svolga un ruolo rilevante nella suscettibilità ai ceppi F4 (Bijlsma et al., 1982; Hu et al., 1993). Alcuni paesi europei, come la Danimarca hanno implementato da molti anni strategie di selezione degli animali per ridurre la frequenza di geni che codificano per la forma recettoriale sensibile all'adesione dei ceppi F4 nella popolazione suina. Per questo l'attuale larga diffusione di genetiche danesi all'interno della suinicoltura italiana, potrebbe aver avuto un ruolo importante nell'inversione di prevalenza tra F4 e F18.
Altri fattori da tenere in considerazione sono interventi profilattici ed in particolare la vaccinazione, cause alimentari e aspetti legati all'agente eziologico, come ad esempio la resistenza agli antibiotici.
Alla luce di queste considerazioni, la caratterizzazione degli ETEC che causano PWD rimane un passo fondamentale per una corretta comprensione dell'epidemiologia, della patogenesi della colibacillosi enterica e per implementare alcune delle strategie sopraccitate con lo scopo di ridurne l'impatto nell'allevamento suino.
Il corretto campionamento di suinetti ammalati combinato ad un appropriato percorso diagnostico, sono requisiti fondamentali per una corretta diagnosi e per l'individuazione del virotipo responsabile del focolaio di PWD. Tutto ciò permette una corretta analisi della problematica e fornisce informazioni per la scelta di misure di controllo e di prevenzione.

BIBLIOGRAFIA

1. Bijlsma I.G.W., De Nijs A., Van Der Meer C., Frik J.F. (1982) "Different pig phenotypes affect adherence of Escherichia coli to jejunal brush borders by K88ab, K88ac, or K88ad antigen." Infect Immun 37:891–894
2. Do K.H., Byun J.W., Lee W.K. (2020) "Virulence genes and antimicrobial resistance of pathogenic Escherichia coli isolated from diarrheic weaned piglets in Korea". J Anim Sci Technol. 62(4):543-552
3. Fairbrother J.M., Nadeau É., Gyles C.L., (2005), *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim Health Res Rev. 6:17–39.
4. Fairbrother JM, Gyles CL. (2012). Colibacillosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. Disease of Swine. 10th ed. UK: Wiley-Blackwell, p. 723–747.
5. Fairbrother J.M., Nadeau E., (2019) Colibacillosis in: Ziemmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., editors. Diseases of Swine, 10 ed. UK: WileyBlackwell, 809

6. García-Meniño I., García V., Alonso M.P., Blanco J.E., Blanco J., Mora A. (2021) "Clones of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli implicated in swine enteric colibacillosis in Spain and rates of antibiotic resistance". Vet Microbiol. 252:108924
7. Garcia V., Intestinal adhesion and subsequent colonization by ETEC depends on F4- or F18-specific receptors, the presence of which is essential for ETEC to cause disease, 2020 American society for Microbiology
8. Hu Z.L., Hasler-Rapacz J., Huang S.C., Rapacz J. (1993) "Studies in swine on inheritance and variation in expression of small intestinal receptors mediating adhesion of the K88 enteropathogenic Escherichia coli variants." J Hered 84:157–165Luppi A., Gibellini M., Gin T., Vangroenweghe F., Vandenbroucke V., Bauerfeind R., Bonilauri P., Labarque G., Hidalgo Á. (2016) "Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe". Porcine Health Manag. 2:20
9. Luppi A. (2017) "Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance". Porcine Health Manag. 3:16
10. Torreggiani C., Prosperi A., Chiapponi C., Manfredi R., Baioni L., Baraldini E., Dottori M., Rugna G., Bassi P., Alborali G.L., Vezzoli F., Luppi A. (2021) "Escherichia coli Enterotossigeni isolati da focolai di Colibacillosi Enterica nel Post-Svezzamento." Atti SIPAS 2021.
11. Vangroenweghe F., Luppi A., and Thas o., (2020), Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Pathotypes and Virotypes Isolated from Piglets Suffering from Post-Weaning Diarrhea in Belgium and the Netherlands, *Archives of Veterinary and Animal Sciences* 2(2). DOI: 10.5281/zenodo.3812470

TRATTAMENTO ANTIELMINTICO DEL SUINO MEDIANTE SOMMINISTRAZIONE CONTINUATIVA (h24) DI FLUBENDAZOLO IN ACQUA DA BERE: RISULTATI PRELIMINARI

ANTHELMINTIC TREATMENT OF PIGS BY CONTINUOUS ADMINISTRATION OF FLUBENDAZOLE (24h/24h) IN DRINKING WATER: PRELIMINARY RESULTS

DE JONG S.[1], ENGELEN B.[1], GUARINI C.P.B. [2], CEVIDALLI A.E.[3]

[1]Dopharma B.V. Olanda; [2]Dopharma Italia Srl; [3]Medico Veterinario

Parole chiave: antielmintico, flubendazolo, *Ascaris suum*
Keywords: anthelmintic, flubendazole, *Ascaris suum*

Riassunto
Ascaris suum è economicamente il verme intestinale più importante nei suini in accrescimento-ingrasso. La percentuale di allevamenti risultati positivi a seguito dell'esecuzione di un esame sierologico sui propri animali, in Italia è risultata pari all'84,1% rispetto a una prevalenza media del 41,5% negli altri paesi europei (1). Questo articolo riporta una sintesi degli studi condotti con Fludosol® (Dopharma), una formulazione brevettata di flubendazolo, per testarne l'efficacia nei confronti *A. suum* in suini sottoposti ad una infestazione sperimentale. Sono stati condotti studi di efficacia mirati sugli stadi migratori, intestinali e adulti. In tutti i casi il prodotto è stato somministrato tramite acqua da bere in modo continuativo (h24). I risultati dimostrano un'elevata efficacia nel ridurre il carico di larve migranti (L3), larve intestinali e vermi adulti. Nei nostri studi, la somministrazione di 2,5 mg/kg di p.c. al giorno di flubendazolo per 2 giorni consecutivi è risultata estremamente efficace nei confronti degli stadi larvali, mentre un regime di 5 giorni alla dose di 1 mg/kg mostra un'efficacia leggermente ridotta. Sia i trattamenti da 2 che da 5 giorni raggiungono un'efficacia del 100% contro i vermi adulti. La stabilità della sospensione di flubendazolo ottenuta con il prodotto testato, facilita un dosaggio preciso e omogeno, e ne permette una somministrazione continuativa (h24). In questo modo viene massimizzata l'efficacia del trattamento e si rende non più necessaria l'interruzione dell'accesso all'acqua da bere ai suini da trattare, nelle ore precedenti la somministrazione del farmaco. Questo articolo evidenzia l'idoneità di Fludosol® per il controllo dell'*A. suum,* somministrato con una modalità che comporta anche implicazioni positive per il benessere dei suini.

Abstract
Ascaris suum is economically the most important helminth in growing-fattening pigs. Prevalence in Italian farms using a serological assay is 84.1% in comparison to the average prevalence of 41.5% of other European Countries (1). This paper summarizes the efficacy trials conducted with Fludosol® (Dopharma), a patented flubendazole formulation, against A. *suum*, evaluated in an induced infection model. Efficacy trials targeting migratory, intestinal, and adult stages were conducted through continuous administration (24h/ 24h) of flubendazole via drinking water. Results demonstrate high efficacy in reducing migratory larval, intestinal larval and adult worm burdens. Flubendazole at 2.5 mg/kg body weight for 2 days effectively eliminates larval stages, while a 5-day regimen at 1 mg/kg shows slightly reduced efficacy. Both 2-day and 5-day treatments achieve 100% efficacy against adult worms. The stable suspension of flubendazole facilitates precise dosing and good dispersion, enhancing treatment efficacy without a need for water restriction of animals. This study underscores the suitability of Fludosol® for A. suum control, offering promising implications for swine health and welfare.

INTRODUZIONE

Ascaris suum è economicamente il verme intestinale più importante nei suini in accrescimento ed ingrasso ed è inoltre un agente zoonotico (2). L'infestazione da *A. suum* comporta lo scarto di fegati al macello a causa delle tipiche macchie bianche conseguenti al passaggio dalle larve migranti (L3) e una maggiore suscettibilità dei suini agli agenti patogeni respiratori a causa della migrazione delle L3 anche in ambito polmonare (3). Negli allevamenti con un'elevata prevalenza di suini infestati, si possono osservare un aumento dell'indice di conversione alimentare (ICA) e un ridotto accrescimento. L'efficacia contro tutti gli stadi del parassita *è importante per ridurre i* danni causati dalla migrazione delle larve e l'effetto negativo degli stadi larvali intestinali e degli adulti sull'ICA e sulla crescita. La prevalenza di *A. suum* varia tra i diversi Paesi europei ed è influenzata dall'età dei suini, da fattori ambientali, stagionali e gestionali, in particolare dall'applicazione o meno di una strategia di controllo mediante l'uso regolare di antielmintici, e dal metodo diagnostico utilizzato (4). Vismarra et al. (5) hanno studiato la prevalenza di *A. suum* negli allevamenti di suini del Nord Italia utilizzando lesioni epatiche e sierologia. Sia le lesioni ("*white spot*") che la positività sierologica sono state riscontrate in quasi tutti gli allevamenti. La prevalenza dei "*white spot*", tuttavia, variava tra il 3,8% e il 98,3%. Tutti gli allevamenti erano positivi alla sierologia. La sierologia si è quindi mostrata più sensibile del rilevamento delle lesioni epatiche (5). Vandekerckhove e Geldhof (1), utilizzando test diagnostici sierologici, hanno riscontrato in Italia una prevalenza dell'84,1%, la più alta tra i Paesi europei inclusi nell'indagine, che in media avevano una prevalenza del 41,5%.

La somministrazione mediante l'acqua da bere è un metodo che di norma permette un dosaggio corretto dei medicinali a tutti gli animali da trattare. Tuttavia, i benzimidazoli sono scarsamente solubili in acqua. Occorre quindi poter disporre di un prodotto che sia allo stesso tempo molto efficace ed altamente disperdibile nell'acqua, anche alle concentrazioni elevate presenti nella pre-soluzione (cosiddetta "soluzione madre"), in cui la sospensione del farmaco, es. flubendazolo, deve risultare omogenea e stabile. Questo è un requisito per potere garantire una concentrazione del farmaco adeguata e stabile nell'acqua da bere e quindi per poter trattare i suini nel modo corretto.

L'azione antielmintica del flubendazolo *è sia concentrazione- che tempo-dipendente* (6). Lo stesso grado di danno ad *A. suum* è stato raggiunto in vitro quando incubato per un periodo più lungo con una quantità bassa (10 µg/ml) o per un periodo più breve in un terreno contenente una quantità elevata di flubendazolo (100 µg/ml). Inoltre, si è riscontrato che quanto più a lungo *A. suum* rimaneva a contatto con il flubendazolo, maggiore era il danno arrecatogli (6).

Lo scopo di questo studio era di valutare l'efficacia di Fludosol® (Dopharma), un medicinale contenente il 20% di flubendazolo, in un modello di infestazione sperimentale. Si tratta di un medicinale la cui formulazione brevettata, consente una dispersione ottimale del principio attivo nell'acqua, dando luogo ad una sospensione stabile di flubendazolo, la cui omogeneità è garantita fino a 24 ore. Questo consente una somministrazione continuativa nell'arco della giornata, permettendo un dosaggio corretto del farmaco a tutti gli animali del gruppo trattato, e massimizzando l'efficacia del flubendazolo, in conseguenza della sua caratteristica di tempo-dipendenza.

MATERIALI E METODI

Sono stati condotti studi di efficacia verso gli stadi larvali migranti e intestinali e verso i vermi adulti utilizzando la somministrazione continua di flubendazolo nell'acqua da bere. Gli studi erano randomizzati con gruppo test e gruppo di controllo negativo e sono stati condotti con animali naïve agli elminti che non erano mai stati trattati prima con antielmintici. I suinetti sono stati infestati sperimentalmente con 1.500 uova embrionate di *A. suum* (giorno 0).

Valutazione dell'efficacia vs. gli stadi larvali

Contro le larve migranti L3, sono stati valutati due trattamenti: 2,5 mg di flubendazolo/kg

p.c./giorno per 2 giorni consecutivi (giorni 6-7) e 1 mg di flubendazolo/kg p.c. /giorno per 5 giorni consecutivi (giorni 4-8), mediante somministrazione continua in acqua da bere. Per l'efficacia contro le larve intestinali L4, è stato valutato un solo approccio posologico (2,5 mg di flubendazolo/kg p.c./giorno per 2 giorni consecutivi), ma la somministrazione del prodotto, sempre tramite medicazione h24 dell'acqua da bere, è stata eseguita nei giorni 11-12. Infine, un quarto gruppo di controllo negativo non ha ricevuto alcun trattamento (Tabella 1).

Gruppi di studio (obiettivo)	N° suini	Prodotto	Dose di flubendazolo (FLBZ) e durata del trattamento
1. Infestazione al giorno 0 e trattamento nei gg 6-7 (efficacia vs. larve migranti L3)	10	Fludosol®	2,5 mg FLBZ/kg p.c. per 2 gg.
2. Infestazione al giorno 0 e trattamento nei gg 4-8 (efficacia vs. larve migranti L3)	10	Fludosol®	1 mg FLBZ/kg p.c. per 5 gg.
3. Infestazione al giorno 0 e trattamento nei gg 11-12 (efficacia vs. larve intestinali L4)	10	Fludosol®	2,5 mg FLBZ/kg p.c. per 2 gg.
4. Infestazione al giorno 0, nessun trattamento (gruppo di controllo)	10	Nessuno	n.p.

Tabella 1. Schema dei trattamenti vs. le forme larvali
Table 1. Overview of larval treatment groups

Allo scopo di determinare l'efficacia dei trattamenti nei confronti delle forme larvali è stata eseguita la conta delle forme larvali intestinali. Gli animali sono stati sottoposti a necroscopia al giorno 14, gli intestini sono stati aperti e il contenuto degli intestini è stato filtrato attraverso un setaccio con una larghezza delle maglie di 2I2 µm, per raccogliere e poi contare tutte le larve intestinali (Fig. 1). L'efficacia è stata determinata dal grado di riduzione degli stadi larvali intestinali (L4) nei 3 gruppi di trattamento rispetto al gruppo di controllo non trattato. L'assenza di larve intestinali (L4) alla necroscopia, dimostrava non solo l'efficacia dello schema di trattamento impiegato verso le L4 stesse (gruppo 3), ma anche l'efficacia dei due schemi di trattamento utilizzati vs. le larve migranti L3 (gruppi 1 e 2), la cui eliminazione ha evitato che potessero evolvere a L4. Se al giorno 14 non venivano trovate larve intestinali, si concludeva che dopo il trattamento non erano presenti larve migranti L3. Il numero di larve intestinali nel gruppo di controllo non trattato è servito per verificare la correttezza della procedura di infestazione sperimentale. Le differenze sono state considerate significative quando $p \leq 0,05$.

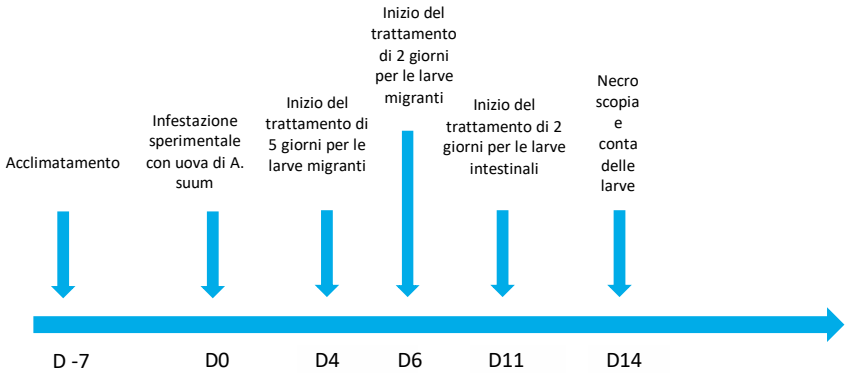


Figura 1 Cronologia dello studio sulle forme larvali
Figure 1 Timeline of larval study

Valutazione dell'efficacia vs. i vermi adulti
Per studiare l'efficacia contro i vermi adulti, i suini sono stati trattati con 2,5 mg di flubendazolo/kg p.c./giorno per 2 giorni (giorni 56-57) o con 1 mg di flubendazolo/kg p.c./giorno per 5 giorni (giorni 56-60), in modo continuo (h24) mediante l'acqua da bere. Il gruppo di controllo è stato infestato sperimentalmente e non ha ricevuto alcun trattamento (Tabella 2).

Gruppi di studio	N° suini	Prodotto	Dose di flubendazolo (FLBZ) e durata del trattamento
1. Infestazione (g0) e trattamento nei gg 56-57	7	Fludosol®	2,5 mg FLBZ/kg p.c. per 2 gg.
2. Infestazione (g0) e trattamento nei gg 56-60	7	Fludosol®	1 mg FLBZ/kg p.c. per 5 gg.
3. Infestazione (g0), nessun trattamento (gruppo di controllo)	7	Nessuno	n.p.

Tabella 2. Schema dei trattamenti vs. i vermi adulti
Table 2. Overview of adult treatment groups

L'efficacia del trattamento nei confronti degli adulti di *A. suum* è stata valutata sia mediante la conta delle uova nelle feci, espressa come n. uova per grammo (EPG), sia mediante il conteggio dei vermi adulti a livello intestinale.
Prima del trattamento (giorno 53) e prima della necroscopia (giorno 67), i campioni fecali sono stati raccolti per via rettale e analizzati per la presenza di uova di A. suum utilizzando il metodo McMaster. Subito dopo (giorno 67), gli animali sono stati sottoposti a eutanasia e a necroscopia (giorno 67) e sono stati contati i vermi adulti nell'intestino (Fig. 2). Le differenze sono state considerate significative quando $p \leq 0,05$.

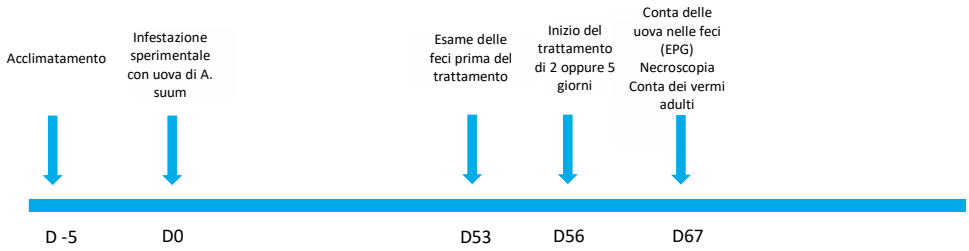


Figura 2 Cronologia dello studio sugli ascaridi adulti
Figure 2 Timeline of adult study

RISULTATI

Stadi larvali
Gli stadi larvali di *A. suum* sono stati riscontrati in tutti i 10 animali del gruppo di controllo (Media Geometrica: 325,2 larve/animale). Il flubendazolo somministrato alla dose di 2,5 mg/kg di peso corporeo al giorno per 2 giorni è risultato efficace al 99,95% (MG: 0,2 larve/animale) sia nei confronti delle L3 migranti che delle L4 intestinali ($p<0,0001$). Lo schema posologico di 1 mg/kg p.c. al giorno per 5 giorni è invece risultato efficace al 93,97% (GM: 19,6 larve/animale) nei confronti delle L3 ($p<0,0001$) (Fig. 3).

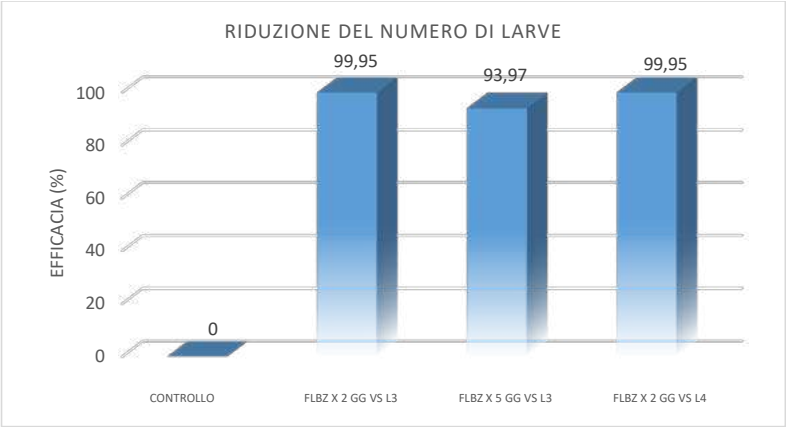


Figura 3 Efficacia nella riduzione degli stadi larvali
Figure 3 Efficacy in reducing larval stages

Vermi adulti
Il flubendazolo, tanto alla dose di 2,5 mg/kg p.c. per 2 giorni quanto a quella di 1 mg/kg p.c. per 5 giorni, ha mostrato un'efficacia del 100% nel ridurre la conta dei vermi adulti (p=0,0006). Inoltre, entrambi i trattamenti sono risultati efficaci rispettivamente al 100% e al 99,99% (media geometrica: 0,8 EPG/animale) nel ridurre il numero di uova di ascaridi nelle feci (p=0,0006). L'infestazione da *A. suum* era stata condotta in modo corretto, come hanno dimostrato i parametri del gruppo di controllo (vermi adulti a livello intestinale: media geom. 37,8/suino; uova nelle feci (EPG): media geom. 6156,6/suino) (Fig. 4).

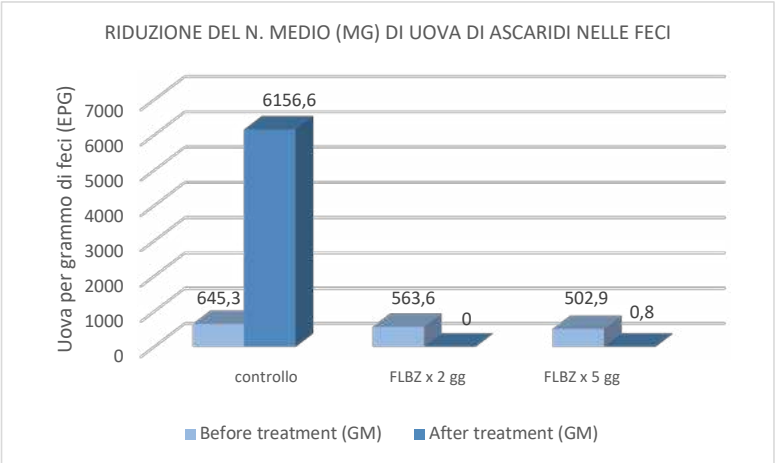


Figura 4. Efficacia nel ridurre la presenza di uova di ascaridi nelle feci
Figure 4. Efficacy in reducing EPG

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le sospensioni preparate con il prodotto oggetto degli studi qui descritti (Fludosol®, Dopharma) rimangono molto stabili e omogenee per 24 ore, rendendo possibile la somministrazione continua tramite acqua da bere 24 ore su 24. Questa modalità di somministrazione garantisce l'accesso all'acqua medicata a tutti i suini del gruppo sottoposto a trattamento e permette di trattare efficacemente ogni singolo animale, riducendo significativamente il rischio di sottodosaggio. Questa modalità di somministrazione risulta anche in linea con la farmacodinamica del flubendazolo, il cui effetto è sia concentrazione-che tempo-dipendente. Inoltre, poiché la somministrazione del prodotto non è limitato a poche ore al giorno, non è necessario stimolare la sete mediante una restrizione dell'acqua prima dell'inizio del trattamento, con un ulteriore vantaggio relativo al benessere degli animali.

Gli studi descritti nel presente articolo hanno evidenziato che la somministrazione continua (h24) di flubendazolo tramite l'acqua da bere, alla dose di 2,5 mg di flubendazolo/kg p.c. per 2 giorni consecutivi è molto efficace nel ridurre il numero sia delle larve migranti (L3) di *A. suum*, sia delle larve intestinali. Lo schema posologico che prevedeva la somministrazione di flubendazolo alla dose di 1 mg/kg p.c. per 5 giorni consecutivi, è risultato leggermente meno efficace e pertanto meno adeguato.

La somministrazione continua (h24) di flubendazolo mediante l'acqua da bere, si è inoltre rivelata molto efficace nell'eliminare i vermi adulti e nel ridurre la conta delle uova fecali (EPG) di *A. suum*, con prevedibile effetto sull'andamento della carica infestante ambientale. Pertanto, il prodotto testato nel corso delle prove sperimentali descritte nel presente articolo, che, grazie alla formulazione brevettata, permette una somministrazione continua (h24) di flubendazolo, è risultato particolarmente adatto al trattamento dei suini infestati da *Ascaris suum*.

BIBLIOGRAFIA

1. Vandekerckhove, E., & Geldhof, P. (2015). Novel insights in the prevalence of Ascaris suum in commercial pig farms in Europe. ESPHM Proceedings.
2. Da Silva, T. E., Barbosa, F. S., Magalhães, L. M. D., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Santos, A. C. D., Nogueira, D. S., Resende, N. M., Amorim, C. C. O., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Viana, A. G., Geiger, S. M., Bartholomeu, D. C., Fujiwara, R. T., & Bueno, L. L. (2021). Unraveling Ascaris suum experimental infection in humans. Microbes and Infection, 23(8), 104836.
3. Jourquin, J., Jacobs, & Van Gelderen. (2008). Impact of migrating ascaris suum larvae on the respiratory disease complex. IPVS Proceedings.
4. Pettersson, E., Sjölund, M., Dórea, F. C., Lind, E. O., Grandi, G., Jacobson, M., Höglund, J., & Wallgren, P. (2021). Gastrointestinal parasites in Swedish pigs: Prevalence and associated risk factors for infection in herds where animal welfare standards are improved. Veterinary Parasitology, 295, 109459.
5. Vismarra, A., Lenti, A., Genchi, M., Kramer, L., & Geldhof, P. (2023) Seroprevalence of ascaris suum compared to milk spot prevalence at slaughter in Italian fattening pigs. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. 1 jan 2023;37:100828.
6. Hanser, E., Mehlhorn, H., Hoeben, D., & Vlaminck, K. (2002). In vitro studies on the effects of flubendazole against toxocara canis and ascaris suum. Parasitology Research, 89(1), 63–74.

VALUTAZIONE DELLE PROCEDURE DI PULIZIA E DISINFEZIONE NELL'ALLEVAMENTO SUINICOLO MEDIANTE L'UTILIZZO DI BIOMARCATORI AMBIENTALI

EVALUATION OF CLEANING AND DISINFECTION PROCEDURES IN PIG FARMING USING ENVIRONMENTAL BIOMARKERS

NOVARA, R.[1], MEI, D.[2], VINCENTI, V.[1], PINNELLI, V.[2], SCOLLO, A.[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO);*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino (TO)*

Parole chiave: procedure di disinfezione, biomarkers, carica batterica
Keywords: disinfection procedures, biomarkers, bacterial load

Riassunto
Le procedure di pulizia e disinfezione (C&D) negli allevamenti suinicoli rappresentano sempre di più un aspetto fondamentale del management aziendale per il controllo e la diffusione delle malattie. Questo studio si propone di valutare l'efficacia delle C&D adottate negli allevamenti suinicoli attraverso l'utilizzo di un questionario e di diversi biomarcatori ambientali. Sono stati selezionati casualmente venti allevamenti intensivi di suini in fase di ingrasso. Ogni allevatore è stato intervistato sulle C&D e sono stati eseguiti dei tamponi ambientali in due fasi: subito dopo lo svuotamento delle stalle ed alla fine delle procedure di pulizia e disinfezione (prima dell'ingresso dei nuovi animali). Sono state analizzate le cariche batteriche di Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e la carica mesofila totale in quattro punti di campionamento: abbeveratoio, mangiatoia, area di defecazione e materiali manipolabili. Sono state applicate una PCA e successiva HCA dalle quali sono stati creati due cluster. Quest'ultimi si differenziavano solo per le cariche batteriche pre-lavaggio. Perciò, sarebbe utile poter indirizzare dei protocolli di C&D più specializzati e mirati negli allevamenti più "sporchi" per rendere evidente l'efficacia delle C&D che non è invece emersa in questo studio. Inoltre, il tubo di alimentazione ed i materiali manipolabili sono risultati essere i punti critici per le C&D e quindi quelli a cui occorre prestare maggiore attenzione.

Abstract
Cleaning and disinfection procedures (C&D) in pig farms increasingly represent a fundamental aspect for the control and spread of diseases. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the C&D adopted in pig buildings with the use of a questionnaire and several microbiological biomarkers. Twenty Italian intensive fattening pig farms were randomly selected. Each farm was interviewed on C&D by a questionnaire, and environmental swabs were sampled two times: right after the pens had been emptied and at the end of C&D (before new animals entered the barn). The Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. and the total mesophilic microbial loads were evaluated in four different sampling sites: nipple drinker, feeding tube, dunging area and manipulable materials. A PCA and subsequent HCA were applied, and two clusters were created. Both clusters showed similar bacterial loads after C&D and similar C&D approaches. They differed only in pre-wash bacterial loads. Therefore, the investigation of bacterial loads in the single farm might be useful to address more tailored and specialized C&D protocols in the "dirtiest" farms. Interestingly, none of the C&D variables considered

in the survey where specifically associated to the reduction of a particular bacterial load. Moreover, the feeding tube and the manipulable materials are the critical points for the C&D in pig farms and therefore those to which more attention should be paid.

INTRODUZIONE

Per biosicurezza si intende l'insieme di misure strutturali, logistico-manageriali e comportamentali volte all'eliminazione o alla riduzione del rischio di introduzione e diffusione di agenti patogeni all'interno di una popolazione al fine di proteggere la salute pubblica, animale ed ambientale (il concetto di "*One Health*") (Reg. UE 2016/429).
Da quando la Peste Suina Africana (PSA) è diventata la malattia epizootica più rilevante dal punto di vista della sanità animale, l'adozione di corrette procedure di pulizia e disinfezione sta acquisendo sempre maggior importanza all'interno delle pratiche di biosicurezza. Le attività di pulizia e disinfezione sono fondamentali per l'inattivazione dei patogeni, per prevenire la diffusione di malattie e per facilitare il ripopolamento dopo un focolaio, ed oggi rappresentano un obbligo normativo importante per tutti gli allevamenti suinicoli ed i relativi mezzi di trasporto, in particolare in caso di aree di restrizione per presenza di PSA sul territorio (Reg. UE 2023/594). Le procedure di base per una corretta disinfezione degli ambienti di allevamento sono brevemente illustrate nel Decreto del 28 giugno 2022 del Ministero della Salute, riportante i requisiti minimi di biosicurezza degli stabilimenti che detengono suini. Sebbene siano chiaramente elencati i passaggi chiave di una procedura corretta (vedi anche Fig. 1), l'applicazione in campo ha notevolissime variabili dettate dalla tipologia di prodotto usate e dalle sue caratteristiche (es. percentuale di diluizione e tempo di contatto), dall'ambiente stesso (es. porosità delle superfici, presenza di anfratti), e dall'operatore (es. meticolosità, cura).
Nei settori agroalimentari, la verifica dell'efficacia delle procedure di pulizia e disinfezione è comunemente effettuata con metodi microbiologici. Negli anni sono stati descritti diversi indicatori microbiologici (o *biomarkers*), i quali forniscono una stima della capacità del programma di sanificazione aziendale. Tra i più diffusi si ritrovano: la conta mesofila totale, gli *E. coli*, le Enterobacteriaceae ed i coliformi (Agüeria et al. 2021; Luyckx et al. 2015).

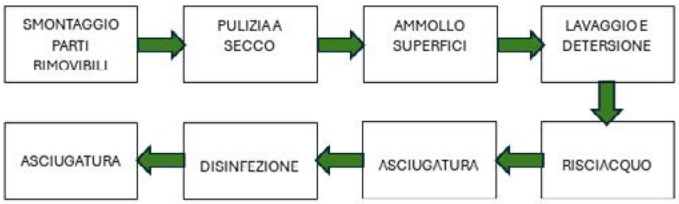


Figura 1. Schematizzazione delle procedure di pulizia e disinfezione in un allevamento suino.
Figure 1. Schematization of cleaning and disinfection procedures in a pig farm.

Questo studio si proponeva di valutare, su un campione rappresentativo di aziende suinicole piemontesi da ingrasso, la reale efficacia delle procedure di pulizia e disinfezione adottate dagli allevatori nel ridurre le cariche ambientali di alcuni biomarkers (*E. coli*, *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp., carica mesofila totale) riscontrate prima delle operazioni di pulizia.
Un secondo obiettivo è stato quello di valutare la presenza di una possibile correlazione tra le differenti caratteristiche dei protocolli di pulizia e disinfezione utilizzati negli

allevamenti suinicoli e la carica di ciascun biomarker al termine delle procedure stesse, consentendo di identificare le pratiche più virtuose da valorizzare in un corretto programma di sanificazione aziendale.

MATERIALI E METODI

Per questo progetto sono stati selezionati 20 allevamenti di suini da ingrasso (sito 3) localizzati in diverse province piemontesi: Torino, Cuneo e Vercelli. Le aziende incluse nello studio sono state scelte casualmente sulla base della localizzazione geografica e del momento produttivo, ovvero a fine ciclo, con suini di circa 9 mesi di età ed un peso vivo di circa 165-170 kg. La lista delle aziende è stata fornita in parte dai veterinari dell'ASL CN1 distretto di Racconigi e in parte da colleghi liberi professionisti operanti sul territorio. Gli allevatori sono stati contattati telefonicamente e hanno aderito al progetto su base volontaria. Il periodo di campionamento si è esteso tra marzo e luglio 2023. Ogni azienda è stata campionata in due momenti: il primo dopo lo svuotamento dei locali di stabulazione degli animali per la loro consegna al macello, ovvero con strutture vuote e ancora sporche; il secondo alla fine delle procedure di pulizia e disinfezione e prima dell'ingresso dei nuovi capi nell'allevamento.
Presso ogni azienda è stato intervistato il personale aziendale mediante un questionario relativo alle procedure di pulizia e disinfezione che sarebbero state adottate per pulire i capannoni, e successivamente sono stati eseguiti dei campioni ambientali.
Durante il campionamento sono state adottate tutte le misure di biosicurezza per l'accesso ai locali di stabulazione: parcheggio dell'auto fuori dal perimetro aziendale e utilizzo di dispositivi di protezione individuale (calzari, camici, cuffiette e guanti monouso).

Questionario

Per raccogliere in maniera oggettiva le informazioni relative alle aziende e alle procedure di pulizia e disinfezione adottate è stato redatto un questionario composto da tre parti: aspetti strutturali (tipologia di pavimento, tipologia di finestre etc.), aspetti gestionali dell'allevamento (numero di giorni di vuoto sanitario e vuoto biologico, etc.) e procedure di lavaggio, detersione e disinfezione. Il questionario si articolava in trenta domande come illustrato nella figura 2.

Valutatore:
Data:

VALUTAZIONE DELLE PROCEDURE DI PULIZIA E DISINFEZIONE

Codice aziendale_____ Denominazione_____

Tipologia di allevamento (sito): 1 2 3 N° capi____

Persona intervistata_____ Proprietario: ☐ si ☐ no Detentore ☐ si ☐ no
Età_____

ASPETTI STRUTTURALI		
1	Pavimentazione	☐ pieno ☐ parzialmente fessurato ☐ totalmente fessurato
2	Alimentazione	☐ asciutto (pellet – sfarinato) ☐ bagnato
3	Abbeverata N° abbeveratoi/capi presenti	☐ tazza ☐ succhiotto ☐ vasca con galleggiante regolatore il livello dell'acqua _____
4	Finestre	☐ pannelli lamellari ☐ singolo pannello vasistas ☐ tenda
5	Reti anti-passero	☐ si ☐ no
6	Stato usura (pavimentazioni, muri, serramenti, attrezzature, soffitti)	_____

ASPETTI GESTIONALI		
7	Viene effettuato il tutto pieno – tutto vuoto? • *Se sì, per:* Sono presenti animali nel locale al momento del campionamento?	☐ si ☐ no ☐ *allevamento* ☐ *capannone* ☐ *settore* ☐ *box* ☐ si ☐ no
8	Quanti giorni di vuoto biologico vengono effettuati tra un ciclo e l'altro?	_____
9	Quanti giorni di vuoto sanitario vengono effettuati tra un ciclo e l'altro?	_____
10	Chi effettua la procedura di detersione/disinfezione? Numero di addetti	☐ proprietario ☐ dipendente _____
11	Viene effettuata una formazione degli addetti sulle procedure di pulizia e disinfezione?	☐ si ☐ no

PROCEDURE DI LAVAGGIO-DETERSIONE-DISINFEZIONE		
12	Vengono rimossi i residui organici (feci, lettiera, alimento) prima di detergere/disinfettare? • *Se sì, come?*	☐ si ☐ no _____
Lavaggio e detersione		
13	Vengono utilizzati dispositivi a pressione?	☐ si ☐ no
14	Vengono utilizzati degli agenti schiumogeni?	☐ si ☐ no
15	A che temperatura viene utilizzata l'acqua?	☐ calda ☐ T° ambiente
16	Che principi attivi vengono utilizzati?	_____
17	Viene applicata una diluizione? • *Se sì, quale?*	☐ si ☐ no _____
18	Viene effettuata l'asciugatura prima della disinfezione?	☐ si ☐ no
Disinfezione		
19	Che dispositivi vengono utilizzati?	_____
20	Che principi attivi vengono utilizzati?	_____
21	Viene applicata una diluizione? • *Se sì, quale?*	☐ si ☐ no _____
22	Viene effettuata l'asciugatura prima dell'introduzione degli animali?	☐ si ☐ no
23	Viene effettuato qualche trattamento della fossa dei liquami? • *Se sì, quale?*	☐ si ☐ no _____
24	Come vengono gestite le acque reflue?	_____ _____
25	Viene effettuato qualche trattamento sulle linee dell'alimentazione? • *Se sì, quale?*	☐ si ☐ no _____
26	Viene effettuato qualche trattamento sulle linee dell'acqua? • *Se sì, quale?*	☐ si ☐ no _____
27	Vengono smontate le parti rimovibili (pannelli, mangiatoie, rastrelliere)?	☐ si ☐ no
28	Viene effettuata una rotazione dei principi attivi? • *Se sì, con che frequenza?*	☐ si ☐ no _____
29	Ci sono fasi della procedura che vengono ripetute? • *Se sì, quali?*	☐ si ☐ no _____
30	E' presente una procedura scritta? • *Se sì, c'è corrispondenza tra quanto scritto e quanto effettuato?*	☐ si ☐ no ☐ si ☐ no

Figura 2. Questionario compilato dagli allevatori che hanno fatto parte del progetto di studio.
Figure 2. Questionnaire completed by the farmers who were part of the study project.

Protocollo di campionamento ambientale

Il campionamento è consistito nell'esecuzione di tamponi ambientali all'interno dei locali di stabulazione dei suini. È stato scelto in maniera casuale un box rappresentativo all'interno dell'allevamento, nel quale sono stati selezionati quattro diversi siti di prelievo identificati mediante numero progressivo: punto di abbeverata (1), punto di alimentazione (2), area di defecazione (3), materiali manipolabili (4).

Il protocollo è stato eseguito prima e dopo le procedure di pulizia e disinfezione, per un totale di otto campioni per azienda.

Le superfici piane (area di defecazione, materiale manipolabile e mangiatoia per alimento secco) sono state campionate attraverso l'utilizzo di garze sterili. Gli abbeveratoi a succhiotto e i tubi di alimentazione liquida sono stati campionati mediante l'utilizzo di tamponi. Entrambi i dispositivi di prelievo sono stati precedentemente imbevuti in acqua peptonata tamponata sterile (Buffered Peptone Water, BPW).

Il campionamento tramite garza sterile è stato effettuato eseguendo movimenti in orizzontale e in verticale in modo da coprire un'area di 25 cm^2 per ogni sito di prelievo. Il campionamento tramite tampone è stato effettuato mediante movimenti rotatori sulla

superficie interna ed esterna dei tubi di alimentazione e abbeverata.
Tutti i campionamenti ambientali sono stati eseguiti secondo le procedure ISO 18593.2018.

Figura 3. Foto sul campo dei siti di prelievo pre e post pulizia e disinfezione: punto di abbeverata (1), punto di alimentazione (2), area di defecazione (3), materiali manipolabili (4).
Figure 3. Pictures of the sampling sites pre and post cleaning and disinfection: nipple drinker (1), feeding area (2), dunging area (3), manipulable materials (4).

Conservazione e trasporto campioni
Le garze ed i tamponi sono stati stoccati all'interno di provette coniche (Falcon®) contenenti BPW nel volume di 5 ml e 1 ml rispettivamente. Le provette sono state identificate con i numeri rappresentativi dei siti di prelievo (1: punto di abbeverata; 2: punto di alimentazione; 3: area di defecazione; 4: materiali manipolabili).
I campioni sono stati conservati refrigerati dal momento del prelievo fino al conferimento presso il laboratorio e processati entro 24 ore.
Il laboratorio presso cui sono state effettuate le analisi è l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Diagnostica Generale, S.S. Patologia Animale.

Analisi microbiologiche per la quantificazione dei biomarkers ambientali
Tutti i campioni sono stati addizionati con 9 oppure 45 ml di BPW rispettivamente per il campione prelevato con tampone e quello prelevato con garza, ottenendo così la diluizione 10^{-1}.
Per quanto riguarda i campioni effettuati prima delle procedure di pulizia e disinfezione (campioni "PRE") è stato prelevato 1 ml dalla diluizione 10^{-1} e sono state effettuate diluizioni da 10^{-2} a 10^{-5} in BPW. La semina è stata effettuata per spatolamento prelevando 100 µl dalle opportune diluizioni. Per la ricerca di *E. coli* sono state seminate le diluizioni 10^{-4} e 10^{-5} su agar MacConkey (MCK, Microbiol), mentre per la ricerca della carica batterica mesofila totale sono state seminate su piastre di Plate Count Agar (PCA, Microbiol). Le piastre sono state incubate rispettivamente a 37°C per 24h ed a 30°C per 48h. Per la conta di batteri del genere *Enterococcus* sono state seminate le diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} su agar Slanetz-Bartley (SBA, Microbiol) e sono state incubate a 42°C per 48h. Le stesse diluizioni sono state seminate sul terreno Baird Parker Agar Base + RPF (RPF, Microbiol) per la ricerca dei batteri del genere *Staphylococcus*. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24h.
Per quanto riguarda i campioni prelevati dopo le operazioni di pulizia e disinfezione (campioni "POST"), è stato prelevato 1 ml dalla diluizione 10^{-1} e sono state effettuate diluizioni da 10^{-2} a 10^{-4}. La semina è stata effettuata per spatolamento prelevando 100 µl dalle opportune

diluizioni. Le diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} sono state seminate rispettivamente su agar MCK e PCA, mentre le diluizioni 10^{-2} e 10^{-3} su SBA e RPF. Tempi e temperature di incubazione sono stati i medesimi dei campioni PRE.
In caso di crescita di colonie si è proceduto alla conta, selezionando poi una colonia per tipo, trapiantandola su Columbia Blood Agar (AS) e inviandola all'identificazione mediante MALDI-TOF (Bruker GmbH).

Analisi statistica
L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata effettuata mediante l'utilizzo del software XLSTAT 2022.2.1 (Addinson, TX, USA, 2022).
Per quanto riguarda l'analisi della correlazione tra i diversi protocolli di disinfezione (domande del questionario) ed il loro effetto sulle cariche batteriche, è stata utilizzata la Principal Component Analysis (PCA) e la Hierarchical Cluster Analysis (HCA) (Scollo et al. 2022). La varianza è stata espressa come la differenza per ciascun parametro tra i risultati prima e dopo la pulizia. Tutti i parametri del questionario sono stati inclusi come variabili supplementari. I fattori con autovalore ≥ 1.0 (criterio di Kaiser) sono stati trattenuti. Nella descrizione dei cluster, solo le variabili con coseno quadrato > 0.2 sono state utilizzate. Ogni parametro del protocollo di disinfezione tratto dalla checklist è stato paragonato tra i clusters ottenuti tramite il test del chi-quadro.
Le differenze di carica batterica tra i diversi siti di prelievo sono stati analizzati dal Kruskal-Wallis test for multiple comparisons con il metodo di Dunn e la correzione di Bonferroni.

RISULTATI

Analisi dei clusters
La PCA e la successiva HCA (Figura 4) applicate alle variabili relative alle cariche batteriche riscontrate nei 20 allevamenti (Enterobacteriaceae, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e carica mesofila) intese come variabili attive, ed alle variabili legate alle procedure di disinfezione intese come variabili supplementari, hanno identificato due gruppi (clusters) principali di aziende. Il cluster A è rappresentato da 8 aziende, il cluster B da 9. Le rimanenti 3 aziende hanno rappresentato 2 ulteriori clusters a sé stanti e non sono state considerate nella discussione in quanto poco rappresentative del campione.
Le caratteristiche di ciascun cluster sono riportate in Tabella 1, ed una breve descrizione è riportata di seguito. Nessuna differenza è stata riscontrata nel protocollo di disinfezione (come da checklist) utilizzato dai due clusters. Tuttavia, la riduzione delle cariche dei biomarkers durante le procedure di disinfezione è stata riscontrata soltanto per la carica mesofila nel cluster A.

- Cluster A: è caratterizzato da aziende con cariche batteriche prelavaggio (Enterobacteriaceae, *Enterococcus* spp. e carica mesofila) più alte. Sono considerate dunque le aziende più "sporche" dopo lo svuotamento dei capannoni e che quindi necessiterebbero di una maggiore attenzione durante il lavaggio. Sono anche le aziende che, durante le operazioni di disinfezione, vedono abbassare significativamente la propria conta mesofila totale.

- Cluster B: è caratterizzato da aziende con cariche batteriche prelavaggio (Enterobacteriaceae, *Enterococcus* spp e carica mesofila) più basse. Sono considerate dunque le aziende più "pulite" dopo lo svuotamento dei capannoni, a prescindere dall'efficacia della disinfezione.

Item	Cluster A	Cluster B
N. allevamenti	8	9
Enterobacteriaceae		
Carica pre lavaggio	4.550.000,5 ± 5.034.186,005[A]	1779545,955 ± 3488935,697[B]
Carica post lavaggio	2604545,455 ± 4181504,929	1751250,000 ± 3405064,911
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio	-1945455,045 ± 5297904,689	-28295,955 ± 5344423,498
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio (%)	13,2 ± 22,2	128 ± 27.2
Enterococcus spp.		
Carica pre lavaggio	664242,758 ± 807625,392[A]	20228,773 ± 56110,982[B]
Carica post lavaggio	90393,939 ± 174832,668	35022,773 ± 41535,141
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio	-573848,818 ± 839967,844	14794,000 ± 43782,744
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio (%)	90,2 ± 22,3	142 ± 34,7
Staphylococcus spp.		
Carica pre lavaggio	901060,606 ± 1094629,930	175569,182 ± 210577,609
Carica post lavaggio	40560,606 ± 73155,996	105250,057 ± 125119,282
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio	-860500,000 ± 1036660,424	-70319,125 ± 178588,804
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio (%)	-82,8 ± 33,6	222 ± 62,7
Carica mesofila		
Carica pre lavaggio	67886363,636 ± 26381177,707[A]	21829546,205 ± 18697951,559[B]
Carica post lavaggio	1940757,576 ± 1273232,941	3626136,443 ± 2415303,574
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio	-65945606,06 ± 26206903,03[A]	-18203409,76 ± 17369081,75[B]
Differenza di carica batterica tra il post ed il prelavaggio (%)	-96,7 ± 2,3[B]	48,7 ± 3,5[A]

Tabella 1. Valori di ciascun parametro legato alla carica batterica riscontrato negli allevamenti dei due clusters. Lettere diverse (A, B) rappresentano differenza statistica tra il cluster A ed il cluster B (p-value < 0,05).
Table 1. Values of each parameter linked to the bacterial load found in the farms of the two clusters. Different letters (A, B) represent statistical difference between cluster A and cluster B (p-value < 0,05).

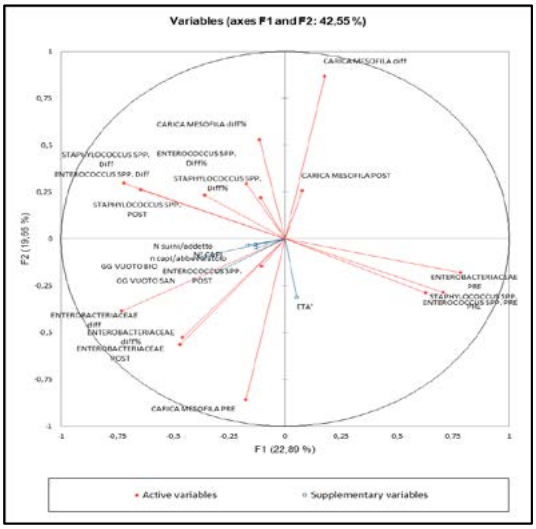


Figura 4. Correlation circle dell'analisi PCA. Le variabili attive sono le cariche batteriche riscontrate nei 20 allevamenti e loro differenza (assoluta e percentuale) tra il post- ed il pre-lavaggio, e sono rappresentate in rosso. Le variabili supplementari sono rappresentate in blu.
Figure 4. Correlation circle of PCA analysis. The active variables are the bacterial loads found in the 20 farms and their difference (absolute and percentage) between post- and pre-washing, and are represented in red. Additional variables are represented in blue.

Cariche batteriche nei siti di prelievo

Per quanto riguarda le Enterobacteriaceae e gli *Enterococcus* spp. non esiste una differenza statisticamente significativa (p-value > 0,05) tra le cariche nei diversi siti di prelievo prima della sanificazione aziendale, mentre esiste una differenza statisticamente significativa (p-value = 0,026 e 0,039) tra le cariche nel post-disinfezione (figura 5). In entrambi i casi, il punto di alimentazione ed i materiali manipolabili sono i siti che presentano le cariche più alte dopo la disinfezione.

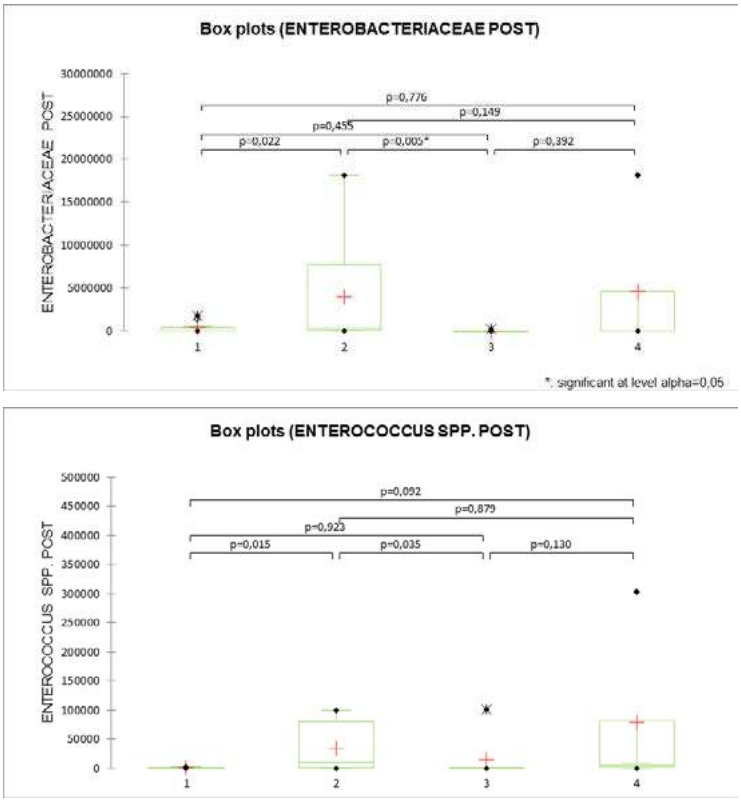


Figura 5. Differenze di carica batterica di Enterobacteriaceae (a sinistra) e di *Enterococcus* spp. (a destra) tra i diversi siti di prelievo dopo (POST) le procedure di pulizia e disinfezione: punto di abbeverata (1), punto di alimentazione (2), area di defecazione (3), materiali manipolabili (4).

Figure 5. Differences in Enterobacteriaceae (left) and *Enterococcus* spp. (right) bacterial load between different sampling sites after (POST) cleaning and disinfection procedures: nipple drinker (1), feeding area (2), dunging area (3), manipulable materials (4).

Per lo *Staphylococcus* spp. non esiste una differenza statisticamente significativa (p-value > 0,05) tra le cariche batteriche nei diversi siti di prelievo né prima né dopo la sanificazione aziendale. Inoltre, non esiste una differenza statisticamente significativa (p-value > 0,05) tra la differenza delle cariche di *Staphylococcus* spp. prima e dopo le procedure di pulizia e disinfezione nei diversi siti di prelievo.

Infine, non esiste una differenza statisticamente significativa (p-value > 0,05) tra la carica batterica mesofila totale nei diversi siti di prelievo né prima né dopo la sanificazione aziendale. Tuttavia, la differenza in valore assoluto tra la carica mesofila tra il post ed il prelavaggio è statisticamente significativa (p-value = 0,05) nei diversi siti di prelievo. Il sito che presenta la minore diminuzione della carica mesofila totale durante le operazioni di pulizia è il punto di alimentazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Un buon programma di sanificazione aziendale è fondamentale per il controllo delle malattie all'interno di un allevamento suinicolo. Un protocollo efficace è costituito da 6 principali step: rimozione del materiale organico, ammollo, lavaggio con detergente, risciacquo, asciugatura e disinfezione (De Lorenzi et al. 2020, Fig. 1). Il primo punto cruciale risiede nella corretta esecuzione di tutte queste fasi. È quindi importante una buona formazione del personale addetto alla disinfezione aziendale.

In questo lavoro, le 20 aziende campionate sono state suddivise in due clusters a seconda delle cariche batteriche di Enterobacteriaceae, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e carica mesofila totale riscontrate nel campionamento pre-lavaggio. Nonostante il cluster A partisse da una condizione con alte cariche di tutti i biomarkes eccezion fatta per *Staphylococcus* spp. (aziende considerate più "sporche") rispetto al cluster B (aziende considerate più "pulite"), le procedure di lavaggio sembrano aver livellato le cariche post lavaggio nei due clusters senza una marcata diminuzione tra il pre e post. Soltanto la carica mesofila totale è calata maggiormente nelle aziende sporche durante il lavaggio, mentre per gli altri biomarkers sembra che l'efficacia delle procedure sia stata trascurabile. Da un lato questo suggerisce che il lavaggio effettuato nelle aziende più sporche è stato in grado di abbassare la carica ai livelli delle aziende pulite, ma dall'altro non è emersa nessuna significatività statistica nel parametro di differenza (riduzione) tra le cariche nel post e nel prelavaggio. Probabilmente, anche se il lavaggio nelle aziende sporche può essere considerato sufficiente per riportare le aziende a livelli di cariche batteriche paragonabili al cluster B, sarebbe necessario valutare con più attenzione i protocolli di disinfezione nel caso di un'azienda sporca ed una pulita. A conferma, le singole procedure di lavaggio analizzate tramite la checklist dei due clusters li caratterizzavano soltanto parzialmente, risultando simili a prescindere dalla carica riscontrata prima del lavaggio.

Per quanto riguarda le differenze di carica batterica nei diversi siti di prelievo, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa prima delle procedure di pulizia e disinfezione. Quindi si può ipotizzare che, durante il ciclo di allevamento, tutti i diversi ambienti dei box si contaminino allo stesso modo, come suggerito dal loro stesso livello di cariche batteriche. Tuttavia, i punti che mantengono alta la carica di alcuni biomarkers anche dopo il lavaggio sono il punto di alimentazione ed i materiali manipolabili. In particolare, le cariche di Enterobacteriaceae e di *Enterococcus* spp. rimangono più alte dopo il lavaggio per entrambi i siti rispetto alle altre aree di campionamento. Infine, per quanto riguarda la differenza di carica mesofila tra il post e il pre-lavaggio, l'area di alimentazione è quella in cui la riduzione di carica mesofila è la meno significativa di tutti, quindi rimane più sporca, a conferma di quello riportato poco fa. Dunque, il sito di alimentazione ed i materiali manipolabili sono da considerarsi come i punti più critici durante le operazioni di lavaggio, e quindi quelli ai quali bisognerebbe dedicare più attenzione.

Una possibile spiegazione a questi risultati, in linea con quanto dimostrato in precedenza (Scollo et al. 2023), risiede nel fatto che i materiali manipolabili non vengono praticamente mai sostituiti tra un ciclo e l'altro. Per quanto riguarda le mangiatoie, un possibile punto critico è il fatto che durante la pulizia e disinfezione vi si depositano i liquidi di lavaggio, che

persistono fino all'ingresso dei nuovi animali in allevamento. Inoltre, la forma tuboidale della calata dell'alimentazione non rende agevole una corretta pulizia interna. Come conseguenza, c'è la possibilità di trasmissione di patogeni tra gli animali di un ciclo produttivo e quello successivo. Dunque, è importante sottolineare come siano sempre da incoraggiare in allevamento dei protocolli di pulizia specifici per le linee di alimentazione.
Concludendo, le aziende che, dopo il ciclo di allevamento, presentano cariche batteriche maggiori, avrebbero bisogno di un protocollo di lavaggio specializzato e più attento rispetto alle aziende con carica batterica inferiore. Questo non accade mai in allevamento, anche perché manca una procedura di verifica dello status aziendale post-ciclo di allevamento. Protocolli più specializzati dovrebbero quindi essere redatti ed applicati, in associazione a metodi rapidi (possibilmente real-time, anche tramite strumentazioni meno sensibili della conta batterica, come ad esempio la misurazione dell'ATP ambientale) di valutazione dell'ambiente prima del lavaggio. Ad esempio, negli allevamenti avicoli in Belgio, la valutazione delle procedure di pulizia e disinfezione tramite igienogramma è diventato obbligatorio da anni, probabilmente grazie alla spinta dovuta alle zoonosi di origine alimentare che hanno come principale protagonista la Salmonella in Unione Europea (Luyckx et al. 2015).

BIBLIOGRAFIA

1. Agüeria, D., Libonatti, C., Civit, D. (2021) Cleaning and disinfection programmes in food establishments: A literature review on verification procedures. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 23–35.
2. De Lorenzi, G., Borella, L., Alborali, G.L., Prodanov-Radulović, J., Štukelj, M., Bellini, S. (2020) African swine fever: A review of cleaning and disinfection procedures in commercial pig holdings. *Research in Veterinary Science*, 132, 262–267.
3. European Union 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*, 84, 1–208.
4. European Commission implementing regulation (EU) 2023/594 of 16 March 2023 laying down special disease control measures for African swine fever and repealing Commission implementing regulation (EU) 2021/605. *Off. J. Eur. Communities*, 79, 65–150.
5. Luyckx, K.Y., Dewulf, J., Van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J., Vervaet, E., M. Heyndrickx, M., De Reu, K. (2015) Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. *Poultry Science*, 94, 740–9.
6. Luyckx, K.Y., Van Weyenberg, S., Dewulf, J., Herman, L., Zoons, J., Vervaet, E., Heyndrickx, M., De Reu, K. (2015) On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses. *Poultry Science*, 94(8), 1986–93.
7. 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. *Animals*, 12(19), 2655.
8. Scollo, A., Perrucci. A., Stella, M.C., Ferrari P., Robino P., Nebbia, P. (2023) Biosecurity and Hygiene Procedures in Pig Farms: Effects of a Tailor-Made Approach as Monitored by Environmental Samples. *Animals*, 13, 1262.

LA GESTIONE DELLE SCROFE IN BOX APERTI. QUALI CONSEGUENZE PER I SUINETTI?

MANAGEMENT OF SOWS IN OPEN FARROWING PENS. WHICH CONSEQUENCES FOR PIGLETS?

MOSCON E[1]., GOTTARDO F[1]., TONON F. [2]

[1] *Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute*
[2] *Suivet*

Parole chiave: Scrofe, box parto, schiacciamento suinetti
Keywords: Sow, Farrowing pen, piglet crushing

Riassunto
Sotto la spinta dell'opinione pubblica europea con l'iniziativa "End the Cage Age", la Commissione Europea si è impegnata a legiferare per l'abolizione della stabulazione in gabbia o recinto individuale negli animali allevati.
In particolare, secondo la normativa vigente per la protezione dei suini in allevamento, il tipo di stabulazione permessa è in gabbia da una settimana dal parto fino allo svezzamento dei suinetti, permettendo la riduzione dello schiacciamento di questi ultimi ma limitando la libertà di movimento della scrofa.
Per risolvere sia il problema dello schiacciamento che la limitazione di libertà delle scrofe, le gabbie parto alternative sono la soluzione dato che permettono un confinamento temporaneo della scrofa.
Lo scopo dello studio è stato individuare quale sia il momento ideale per aprire le gabbie a distanza dal parto (3°, 4°, 5° e 6° giorno). L'effetto del momento di apertura della gabbia sul numero di suinetti schiacciati e sul loro accrescimento è stato valutato anche considerando l'ordine di parto nelle scrofe.
Dai risultati ottenuti si osserva che il maggior numero di schiacciamenti si verifica entro le prime 24 ore dal parto ($p < 0.0001$) e che le scrofe pluripare hanno la tendenza a schiacciare con maggior frequenza rispetto alle primipare, specialmente il giorno del parto ($p < 0.03$).
Seppur in assenza di significatività statistica, si è osservato un trend di schiacciamento minore quando l'apertura della scrofa è più precoce (3° e 4° giorno dal parto), risultato in contrasto con l'opinione generale degli allevatori.

Abstract
Under the pressure of European public opinion with the "End the Cage Age" initiative, the European Commission has committed to legislate on the issue and abolish the use of cage housing in various species.
According to current legislation, the type of housing allowed is in a cage from one week from farrowing until weaning of the piglets, thus reducing the phenomenon of crushing of the latter but limiting the sow's freedom of movement.
One of the proposals to solve both the crushing problem and the restriction of freedom of sows are alternative farrowing cages that allow the sow to be kept in temporary confinement for a short period after farrowing.
The aim was to identify the ideal time to open alternative farrowing cages at different distances (third, fourth, fifth and sixth day) from farrowing. In relation to the time of opening, the farrowing order factor in sows and the growth of piglets were evaluated.

The results obtained confirm that the greatest number of crushes occur within the first 24 hours after farrowing (p-value <0.0001) and that multiparous sows tend to crush more frequently than first-time sows, especially on the day of farrowing (p- 0.028) and beyond the third day after farrowing (p- 0.021).
Although there was no statistical significance, a lower crushing rate was observed in cases where the cage was opened earlier (third and fourth day after farrowing), a result in contrast to the general opinion of farmers.

INTRODUZIONE

In Italia la scrofaia si divide in due fasi principali: la fecondazione-gestazione e il parto-allattamento; entro ciascuna fase le scrofe vengono gestite in diverse tipologie di stabulazione. Le tipologie di stabulazione e le tempistiche di utilizzo sono definite dalla Direttiva 2008/120/CE che detta le norme minime per le protezioni dei suini e recepita a livello nazionale con il Decreto Legislativo n. 122 del 07/07/2011.
Questa normativa nasce in seno alla Commissione europea, sulla base del report presentato dal comitato scientifico veterinario (SCAW, 1997) e dei successivi report EFSA[7, 8], con lo scopo di favorire il benessere dei suini garantendo la manifestazione di normali interazioni sociali e di ridurre le anomalie comportamentali (stereotipie e morsicature). Secondo la normativa vigente, per la fecondazione le scrofe possono essere tenute in stabulazione individuale per un massimo di 4 settimane dopo la fecondazione al fine di individuare più facilmente l'inizio dell'estro e poter così inseminare la scrofa.
Durante la fase di gestazione, le scrofe gravide, a partire dalla quarta settimana dopo la fecondazione fino all'ultima settimana prima del parto, vengono spostate in box di gruppo con dimensioni e numerosità stabilite dalla normativa sopra indicata.
Nel settore parto-allattamento, la stabulazione che viene comunemente adottata è un box parto individuale, seguendo la legislazione vigente sul benessere animale. La struttura raccoglie sia i suinetti liberi di muoversi all'interno del box sia la scrofa confinata in un apposito recinto per limitare i movimenti e la possibilità di schiacciamento dei suinetti stessi.
In questa sede la scrofa rimane da una settimana dalla data presunta del parto fino allo svezzamento dei suinetti. Il periodo di allattamento (suinetti sotto madre che si alimentano con il latte prodotto dalla scrofa) sempre per effetto del Decreto Legislativo di recepimento n 122 deve durare almeno 28 giorni; si ha la possibilità, tuttavia, di ridurre il periodo sotto scrofa a 21 giorni se i suinetti per la fase successiva (svezzamento) vengono trasferiti in impianti specializzati che attuano cicli di tutto pieno - tutto vuoto (TPTV).
I requisiti minimi di legge che sono previsti da normativa vigente considerano oltre alla stabulazione anche la superficie libera per capo, la pulizia, l'adeguatezza della gestione dell'allevamento considerando il microclima (isolamento termico, riscaldamento, monitoraggio della temperatura…), il livello di illuminazione (intensità e piano luce), la qualità dell'aria (controllo dei gas, ricambio dell'aria), l'alimentazione e la pulizia delle strutture anche in funzione del tipo di pavimentazione (pavimento pieno, grigliato, eventuale presenza di lettiera).
Nello specifico per le scrofe e scrofette viene evidenziata la necessità di avere "zona libera che renda agevole il parto naturale o assistito" e nel caso specifico della sala parto "le scrofe possono muoversi liberamente devono essere provviste di strutture (ad esempio apposite sbarre) destinate a proteggere dallo schiacciamento dei lattonzoli".
Tra i principali problemi che ci sono nelle sale parto della scrofaia, lo schiacciamento dei suinetti da parte della madre è il più frequente e di difficile risoluzione.
Il fenomeno dello schiacciamento è responsabile del 20-40% delle mortalità che si hanno in scrofaia[1] ed ha origini multifattoriali, in quanto dipende dai suinetti stessi, dalla madre e

dall'ambiente in cui si trovano gli animali.
La morte dei suinetti per schiacciamento è dovuta ai movimenti improvvisi della scrofa, solitamente durante il passaggio dalla posizione seduta o in stazione al decubito[14] ed anche per l'evidente differenza di dimensioni fra la madre e la prole. I tipi di lesioni che si ritrovano sono di natura traumatica e di soffocamento, specialmente quando i suinetti rimangono intrappolati sotto il corpo della madre per un tempo prolungato[14].
I suinetti che sono più a rischio di schiacciamento sono:

1. I sottopeso, molto spesso inseriti in nidiate numerose dove si verifica una forte competizione per il capezzolo[13]
2. Gli ultimi nati per i quali si ha una minor assunzione di colostro data la competitività con i fratelli e la conseguente inedia, legata alla mancanza di alimento[1].

Il fattore ambientale e di gestione del momento del parto diventano fondamentali per ridurre il rischio di schiacciamento dei suinetti.

Data l'imminente necessità di cambiamento delle strutture di stabulazione nella gestione delle scrofe, è fondamentale trovare delle proposte che vadano incontro agli allevatori e ai sistemi presenti nel nostro territorio.
Per il settore fecondazione-gestazione si è pensato di attuare la stabulazione in gruppo già dal momento della fecondazione, eliminando quindi la stabulazione individuale tipica di quella fase.
I vantaggi nella stabulazione collettiva per l'intera gestazione sono: una maggior libertà di movimento delle scrofe e quindi uno stato maggiore di comfort[4], un minor costo d'investimento per le strutture e una miglior stimolazione e rilevazione dei calori. A questi vantaggi però si affiancano anche due potenziali problematiche: la competizione alimentare, molto forte in questa specie e lo stress sociale specialmente nella fase iniziale[2].
Per ovviare al problema della competizione alimentare ci si può servire di separatori in mangiatoia o chiusura temporanea dell'animale in stalli individuali, durante la quale è possibile effettuare anche l'inseminazione. Per ridurre lo stress sociale si possono creare gruppi stabili di piccole dimensioni.
In sala parto-allattamento, i sistemi alternativi prevedono seppur una stabulazione individuale, l'utilizzo di gabbie a confinamento temporaneo o sistema SWAP (Sow Welfare And Piglet protection pen)[11] con maggiori dimensioni e contenimento per un periodo più ridotto rispetto alle tradizionali gabbie-parto.

MATERIALI E METODI

La ricerca si è svolta presso l'azienda agricola "La Grazia" ubicata a San Martino nel comune di San Biagio di Callalta (TV), di proprietà di Loris Scarabello e la moglie Rosaria. L'allevamento è costituito da una scrofaia di 1300 scrofe e uno svezzamento di nuova costruzione per 7700 posti. Per rispettare le norme di biosicurezza, gli edifici sono stati realizzati a debita distanza l'uno dall'altro.
Nella scrofaia sono stati realizzati due nuovi edifici destinati a contenere i box parto di nuova concezione con sistema SWAP destinati a sostituire le sale parto tradizionali. La nuova area parto è costituita da 4 sale contenenti 48 box parto ciascuna, debitamente separate da corridoi.
I box parto installati sono della ditta Evoteck S.r.l. (Manerbio (BS) – Italia) modello Welsafe. La superficie totale del box parto è di 7 m^2; l'orientamento della struttura che contiene la scrofa è con la mangiatoia verso il corridoio di ispezione così come il nido, collocato in prossimità.

La genetica presente in questa azienda è l'ibrido commerciale Goland viene eseguita inseminazione artificiale con materiale seminale di verro Goland C21, (Gorzagri s.s. Fonzaso Belluno, Italia) questa genetica non ha doti di iperprolificità ma è autorizzato dal consorzio del prosciutto di Parma DOP.

In questa azienda l'introduzione delle scrofe avviene 5 giorni prima del parto (lunedì, con parto programmato per venerdì) e vengono spostate in sala fecondazione al momento dello svezzamento (21 giorni dopo il parto). Tra un ciclo e il successivo si eseguono accurate pulizie e disinfezione.
Lo studio ha valutato 4 condizioni sperimentali finalizzate ad individuare il momento ottimale di apertura della gabbia parto per lasciare maggiore libertà di movimento alla scrofa e minimizzare il rischio di schiacciamento dei suinetti:

- Apertura a 3 giorni dal parto
- Apertura a 4 giorni dal parto
- Apertura a 5 giorni dal parto
- Apertura a 6 giorni dal parto

Lo studio ha avuto una durata di osservazione dal 20 ottobre 2022 al 21 marzo 2023, individuando 5 cicli (54 primipare e 201 con almeno 2 parti totali) da 64 scrofe ciascuno.
Si sono considerati 4 box per ogni tesi, mentre i restanti 48 box presenti nella sala sono stati divisi in modo omogeneo nelle tesi "apertura a 4 giorni dal parto" e "apertura a 6 giorni dal parto". La scelta è stata condivisa con l'allevatore dato il timore di maggiori perdite con apertura precoce rispetto al parto.
L'accrescimento medio giornaliero dei suinetti sotto scrofa è stato valutato su un totale di 73 nidiate pesando singolarmente i suinetti al pareggiamento e allo spostamento dei suinetti nel settore di svezzamento.
La scelta di quali scrofe e quando andavano aperte veniva eseguita cercando di includere sempre almeno 2 primipare e 2 pluripare per tesi.
I dati relativi alla nidiata di ciascuna scrofa sono stati raccolti secondo prassi aziendale mediante delle schede cartacee posizionate davanti ad ogni box dove venivano riportate tutte le principali informazioni:codice identificativo aziendale, data di nascita, data di parto prevista, data copertura, ordine di parto, data del parto effettiva, dati relativi al parto (numero nati vivi, numero nati morti, numero mummificati, numero schiacciati e data nei quali sono stati trovati) ed eventuali trattamenti fatti sulla scrofa o sui suinetti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Con i dati disponibili è stato possibile valutare l'andamento degli schiacciamenti prima dell'apertura di tutte le gabbie parto, ossia il giorno del parto (giorno 0) e i due successivi. Da letteratura è noto, infatti, che gli schiacciamenti si verificano nelle prime 24 /48 ore dal parto[15,10].
La percentuale di schiacciati è stata calcolata come rapporto tra suinetti vivi presenti complessivamente rispetto al numero di schiacciati della giornata.
Il tasso di maggior schiacciamento si è registrato il giorno del parto (0) con un valore percentuale di 1,29 e il primo giorno dopo il parto (1) con un valore di 1,34 con gabbia ancora chiusa.
Questo risultato si è dimostrato essere statisticamente significativo (p-value <0,0001) ed è confermato anche da letteratura, sia nello studio di Svendensen, J. (1992) con maggiore di rischio di schiacciamento nelle 72 ore successive al parto, sia nello studio di Yun et al. (2019) con morte da schiacciamento tra i suinetti già nelle prime 24 ore.

Considerando sempre lo schiacciamento dei suinetti in relazione alle quattro tesi prese in esame, si sono osservate differenze significative (p-0,92). Questo risultato depone a favore della possibilità di aprire la gabbia molto presto (3 giorni dopo il parto) passata quindi la primissima fase di vita del suinetto quando può essere ancora debole e poco reattivo.
Una possibile ipotesi in merito a ciò è che la comunicazione tra scrofa e suinetti sia differente nei primi giorni del parto rispetto al 5° o 6° giorno; ma questa ipotesi da letteratura non viene confermata. Un'altra ipotesi relativamente ai risultati ottenuti può essere che ci sia una fase di apprendimento da parte dei suinetti nei primi giorni dopo il parto in merito alla modalità di movimento della scrofa e degli spazi nei quali posizionarsi per evitare lo schiacciamento. Questo potrebbe spiegare perché con l'apertura della gabbia al 5° o 6° giorni si ha avuto uno schiacciamento maggiore (rispettivamente 2,3% e 2,2%) rispetto al 3° e 4° giorni (1,4% e 1,9%).
Seppur non confermata a livello statistico, lo schiacciamento che aumenta se si prolunga il tempo di chiusura della scrofa è una informazione molto importante dal punto di vista pratico e che va in opposizione al pensiero generale degli allevatori. Diventa quindi necessario incrementare i dati raccolti per le tesi relative al 3° giorno che è l'opzione più promettente in termini di benessere della scrofa e dei suinetti.

In letteratura ci sono pareri discordanti sulla mortalità dei suinetti in relazione alla modalità di confinamento temporaneo o meno della scrofa dopo il parto. Secondo Condous et al. (2016) si è riscontrata una mortalità pre-svezzamento ridotta con scrofa confinata al momento del parto; questo studio aveva confrontato le gabbie parto convenzionali con quelle aperte al 3° e al 7° giorno di lattazione, riscontrando un tasso di mortalità maggiore con momento di apertura del box al 3° giorno rispetto al 7° giorno e al gruppo di controllo (scrofe sempre chiuse).
Altri studi, come ad esempio Weber et al. (2007), evidenziano una mancanza di differenze nella mortalità dei suinetti tra le due tipologie di stabulazione adottate (gabbia aperta e gabbia chiusa), anche se si erano evidenziati dei valori significativamente più elevati di schiacciamento nei recinti con scrofe a stabulazione libera (0,62 vs 0,52 suinetti per nidiata).
Un recente studio svolto da Cheon et al. (2022) in Korea ha riportato risultati opposti agli studi precedenti anche relativamente allo schiacciamento: si sono divise 64 scrofe in modo casuale tra una stabulazione a gabbia chiusa tradizionale ed una con confinamento temporaneo fino al 4° giorno dopo il parto. Si è osservato che il numero di suinetti schiacciati tra i due sistemi non è stato influenzato dalla tipologia di stabulazione.

Nello studio abbiamo anche valutato l'impatto dell'età e dell'esperienza delle scrofe nel determinare lo schiacciamento dei suinetti. Le scrofe incluse nello studio sono state suddivise in base all'ordine di parto in Primipare e Pluripare. Con il termine primipare si intende un suino femmina al primo parto, mentre con pluripare si sono considerate scrofe con un numero di parti uguali o superiori a due.
L'ordine di parto ha un effetto significativo sulla percentuale di schiacciati, in particolare si registra una percentuale di schiacciamento superiore per le pluripare rispetto alle primipare sia il giorno del parto (0,3 vs 1,5 %, p- 0,02), al terzo giorno dal parto (1 vs 2,6 %; p-0,021) e successivamente all'apertura della gabbia (0,81 vs 2,3 %; p- 0,029).
Un trend simile è stato osservato anche da Olsson et al (2019) dove il gruppo di scrofe coinvolte nella sperimentazione era stato ripartito in 3 categorie in base all'ordine di parto: scrofe giovani fino al 2° parto, scrofe intermedie (3-4 parti) e scrofe più anziane oltre 4 parti. Le osservazioni poi si sono concentrate sulla rilevazione degli schiacciamenti entro il 3° giorno dal parto con due diversi sistemi di stabulazione: box libero o gabbia temporaneamente

confinata. I risultati ottenuti da Olsson e colleghi hanno evidenziato come per le scrofe più giovani il tasso di mortalità fosse del 16,3%, per le intermedie fosse un 20,6% e del 28,5% per le scrofe anziane.
Le motivazioni che possono giustificare questi risultati sono principalmente due:

- riduzione della reattività materna con l'aumentare dell'ordine di parto; perché le più anziane sono più pesanti e goffe rispetto alle più giovani e presentano più frequentemente problemi di salute (danno agli arti e ai capezzoli)
- scrofe più anziane hanno generalmente nidiate più numerose con suinetti spesso sottopeso.

Per quanto riguarda invece l'impatto della combinazione tra l'ordine di parto della scrofa e il giorno di apertura della gabbia sullo schiacciamento dei suinetti non si sono osservate differenze significative (Tabella 2).
Tabella 2: Percentuali di schiacciamento dei suinetti in funzione dell'ordine di parto e del momento di apertura della gabbia
Table 2: Piglet crushing rates as a function of farrowing order and time of cage opening

Momento di apertura della gabbia dal parto (giorni)	Primipare		Pluripare		p-value
	Valore assoluto	Valore percentuale (%)	Valore assoluto	Valore percentuale (%)	
3	1	1,2	2	1,7	**0,999**
4	1	0,5	20	2,3	**0,129**
5	0	0,0	5	4,3	**0,102**
6	3	1,4	19	2,4	**0,558**

L'aspetto più interessante di questi dati è che, in termini generali, le scrofe pluripare possono determinare uno schiacciamento maggiore rispetto alle primipare indipendentemente dal momento di apertura della gabbia e questo viene confermato anche in letteratura[10].

Per quanto riguarda l'accrescimento medio giornaliero dei suinetti nelle diverse condizioni sperimentali considerate non si sono osservate differenze statisticamente significative (p- 0,486). Si può osservare, però, che il valore medio di ADG rilevato nei suinetti è stato maggiore in assoluto nel caso di apertura della gabbia al 6° giorno rispetto alle altre tesi considerate. Tuttavia, si può anche ipotizzare che per effetto di un maggior schiacciamento i suinetti che arrivano a fine lattazione sono in numero minore e quindi con minor competizione per accedere ai capezzoli. Questo trend è in opposizione a quanto si rileva in letteratura, infatti nello studio di Oostindjer et al., (2010) che ha valutato gli effetti più a lungo termine della stabulazione libera rispetto alla stabulazione confinata sulla crescita dei suinetti dal 15° giorno fino allo svezzamento, i risultati ottenuti sono di un maggior accrescimento per i suinetti con stabulazione libera (p-0,10). Trend riscontrato anche negli studi di Baxter ed Edwards (2021) e Pedersen et al (2011). Un risultato concorde è stato trovato nello studio di Nowland et al., (2019) dove l'ingestione di colostro è stata maggiore per i suinetti nati da scrofe con stabulazione libera portando ad un peso individuale allo svezzamento maggiore.
Tuttavia, nello studio coreano di Cheon et al. (2022) con gabbie parto alternative aperte a 4 giorni dal parto non si sono notati cambiamenti nel peso dei suinetti.

CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo articolo è stato quello di cercare di individuare le migliori strategie di gestione dei box parto alternativi che prevedono la possibilità di apertura e chiusura della gabbia di contenimento della scrofa nel corso della lattazione.

Questo studio ha preso in esame 4 condizioni sperimentali finalizzate ad individuare il momento ottimale di apertura della gabbia parto per lasciare maggiore libertà di movimento alla scrofa e minimizzare il rischio di schiacciamento dei suinetti. Le condizioni testate sono state l'apertura a 3, 4, 5, o 6 giorni dal parto.

Nello studio si è valutato in primo luogo l'andamento degli schiacciamenti in base alla distanza (giorni) dal parto con il recinto per la scrofa chiuso. I risultati ottenuti sono stati concordi con la letteratura: il tasso di schiacciamento è maggiore nelle prime 24 ore dal parto.

Per quanto riguarda invece l'effetto del giorno di apertura della gabbia dopo il parto sullo schiacciamento dei suinetti non si sono registrate differenze significative tra le tesi anche se tendenzialmente l'opzione di aprire la gabbia a tre giorni sembra essere quella più promettente sia per il benessere della scrofa che dei suinetti. Su questo aspetto ulteriori verifiche sono utili anche per incentivare gli allevatori a adottare questa nuova modalità di gestione.

Relativamente all'impatto dell'ordine di parto sullo schiacciamento dei suinetti si è osservato che nelle scrofe pluripare lo schiacciamento dei suinetti tendenzialmente è maggiore e si manifesta con un trend vicino alla significatività statistica soprattutto quando l'apertura del recinto è più lontana dal momento del parto (5° e 6° giorno rispetto al 3° e 4°).

Per cercare di contenere questa specifica situazione si può cercare di intervenire dal punto di vista gestionale durante la fase di pareggiamento, selezionando nidiate meno numerose e più vigili da assegnare alle scrofe anziane.

In termini di accrescimento medio giornaliero non si sono evidenziate differenze statisticamente significative anche se per questo parametro si è osservato un tendenziale miglioramento per le nidiate con apertura della gabbia al 6° giorno dal parto.

I dati preliminari ottenuti potranno fornire delle indicazioni pratiche agli allevatori e ai tecnici del settore utili a gestire al meglio le gabbie parto alternative per le quali le esperienze applicative su larga scala sono ancore modeste, permettendo di migliorare benessere animale e di conseguenza anche le performance riproduttive e produttive, seppur l'attenzione dello studio sia stata destinata prevalentemente al problema zootecnico degli schiacciamenti.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia integrale nel file completo.

1. Andersen I. L., Berg S., Bøe K. E. (2005). "Crushing of piglets by the mother sow (Sus scrofa) - Purely accidental or a poor mother?" Appl. Anim. Behav, 93(3–4), 229–243.
2. Anil L., Anil S.S., Deen J., Baidoo S.K., Wheaton J.E. (2005) "Evaluation of well-being, productivity, and longevity of pregnant sows housed in groups in pens with an electronic sow feeder or separately in gestation stalls." Am J Vet Res. 66(9),1630-8.
3. Baxter E. M., Edwards S. A. (2021). "Understanding the behaviour and improving the welfare of pigs" in: Burleigh Dodds Science Publishing. (1st ed.), 594
4. Capoferri R., Parati K., Puglisi R., Moscati L., Sensi M., Lombardi G., Sandri G., Briani C., Galli A. (2021) "Comparison between Single- and Group-housed Pregnant Sows for Direct and Indirect Physiological, Reproductive, Welfare Indicators and Gene Expression Profiling." Appl. Anim. Behav.;24(3):246-259.
5. Cheon S. N., Jeongs. H., Yoo G.Z., Lim S.J., Kim C.H., Jang G. W., Jeon J.H. (2022) "Effect of alternative farrowing pens with temporary crating on the performance of lactating sows and their litters." J Anim Sci Technol ; 64(3):574-587

6. Condous P.C., Plush K.J., Tilbrook A.J., van Wettere W.H. (2016) "Reducing sow confinement during farrowing and in early lactation increases piglet mortality." J Anim Sci, 94(7),3022-9.
7. European Food Safety Authority (EFSA) (2007) "Animal health and welfare aspects of different housing and husbandry systems for adult breeding boars, pregnant, farrowing sows and unweaned piglets - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare". EFSA Journal, 5(10). 572
8. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen S.S., Alvarez J., Bicout D.J., Calistri P., Canali E., Drewe J. A., Garin-Bastuji B., Gonzales Rojas J. L., Schmidt G., Herskin M., Michel V., Chueca M. A., Mosbach-Schulz O., Padalino B., Roberts H. C., Stahl K., Velarde A., Viltrop A., Winckler C., Edwards S., Ivanova S., Leeb C., Wechsler B., Fabris C., Lima E., Mosbach-Schulz O., Van der Stede Y., Vitali M., Spoolder H. (2022) "Welfare of pigs on farm". EFSA Journal, 20 (8) e07421
9. Nowland T.L., Ernest W.H., van Wettere J., Plush K.J. (2019). "Allowing sows to farrow unconfined has positive implications for sow and piglet welfare." Appl. Anim. Behav, 221, 104872
10. Olsson, A.C., Botermans, J., Englund, J.E. (2019) "Piglet mortality – A parallel comparison between loose-housed and temporarily confined farrowing sows in the same herd." Acta Agric. Scand. A Anim. Sci 68(1) 52-62.
11. Skovbo D. K. F., Hales J., Kristensen A. R., Moustsen V. A. (2022) "Comparison of management strategies for confinement of sows around farrowing in Sow Welfare and Piglet protection pens." Livest. Sci. 263, 105026
12. Svendensen, J. (1992) "Perinatal mortality in pigs." Anim. Reprod. Sci. 28 (1-4), 59-67
13. Thorup F. (2009). "Come assicurare la sopravvivenza dei suinetti nelle nidiate numerose." Large Anim. Rev. 15, 89-91
14. Weary D.M., Phillips P.A., Pajor E.A., Fraser D., Thompson B. K. (1998). "Crushing of piglets by sows: effects of litter features, pen features and sow behaviour." Appl. Anim. Behav, 61(2), 103–111.
15. Yun J., Han T., Björkman S., Nystén M., Hasan S., Valros A., Peltoniemi O. (2019). "Factors affecting piglet mortality during the first 24 h after the onset of parturition in large litters: Effects of farrowing housing on behaviour of postpartum sows." Animal, 13(5), 1045–1053.

EFFETTO DELLA NUMEROSITÀ DEL GRUPPO SULLE MORSICATURE E SULLE PRESTAZIONI RIPRODUTTIVE DI SCROFE IN GESTAZIONE

THE EFFECT OF GROUP SIZE ON BITING BEHAVIOUR AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF GESTATING SOWS

PINZANO A., GOTTARDO F., TONON F.

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

Parole chiave: benessere animale, scrofe, performance
Keywords: animal welfare, sows, performance

Riassunto
La normativa in vigore, relativa alla protezione dei suini in allevamento, prevede che le scrofe gravide siano allevate in gruppo almeno dalla quarta settimana post-inseminazione fino alla settimana antecedente il parto. Lo scopo del presente studio è quello di verificare l'effetto della numerosità del gruppo di imbrancamento sull'aggressività e sugli esiti di tali comportamenti in termini di lesioni e sulle performance riproduttive. Nello studio, le scrofe sono state stabulate in 2 box da 8 scrofe e 1 box da 16 scrofe nei quali erano presenti 1 o 2 stalli individuali come area di protezione per i soggetti potenzialmente subordinati. I dati raccolti hanno riguardato il numero di morsicature, il numero di soggetti in stazione e la presenza di scrofe all'interno degli stalli di protezione. I dati relativi alle performance riproduttive hanno riguardato il numero di aborti, la durata della gestazione, il numero di suinetti nati vivi, nati morti e mummificati. I risultati dello studio hanno evidenziato che l'imbrancamento in gruppi più numerosi mantenendo invariato lo spazio a disposizione di ciascuna scrofa possa essere utile al fine di ridurre l'aggressività, inoltre le performance riproduttive delle scrofe stabulate nei gruppi più numerosi sono risultate migliori con un minor tasso di aborti. L'impiego di stalli di protezione e di barriere fisiche si sono dimostrati una misura efficace per ridurre il numero di morsicature e la durata delle aggressioni.

Abstract
The legislation in force require housing pregnant sows in groups from the 4th week after insemination to the week before farrowing. The aim of the present study is to verify the effect of the group size on aggression and stress indicators within the housing group and how these can affect farrowing performances. The study considered 2 pens of 8 animals and 1 pen of 16 animals. Individual stalls were placed inside the housing area in order to provide a safe area for the subordinated sows. The stress indicators considered for each group included the number of bites, the number of subjects in standing position and the occupation of the protection stalls. The reproductive performance indicators considered included the occurrence of farrowing or abortion, the farrowing length, the number of piglets born alive, stillborn and mummified. The results demonstrated that farrowing groups of 16 pregnant sows at the same housing density as smaller groups of pregnant sows, can be useful in order to reduce the stress during gestation. The study showed that reproductive performances of the sows housed in larger groups were improved with a higher farrowing rate. Furthermore, this study proved that placing protective stalls and physical barriers in the housing area is an effective way to reduce the number of bites between the sows.

INTRODUZIONE

La normativa in vigore relativa al benessere dei suini in allevamento è rappresentata dalla direttiva europea 2008/120/CE e dalla normativa nazionale D.lgs. 122/2011. Per quanto riguarda il settore da riproduzione vengono stabiliti alcuni parametri per garantire delle condizioni minime di benessere alle scrofe, tra questi parametri ricordiamo la superficie minima a disposizione di ciascuna scrofa, le dimensioni minime del box di stabulazione, le tipologie di pavimentazione consentite e la presenza di arricchimenti ambientali nei box. Inoltre viene stabilito che dalla 4° settimana post-inseminazione fino alla settimana antecedente il parto le scrofe vengano allevate in box di gruppo. La stabulazione delle scrofe in gruppo porta però allo sviluppo di comportamenti di aggressione tra i componenti del gruppo stesso, evidenti soprattutto durante la fase di formazione della scala gerarchica (Pacheco, 2015). Inoltre le aggressioni vengono registrate più frequentemente qualora l'accesso all'alimento sia limitato e la superficie libera a disposizione di ciascuna scrofa sia insufficiente (Pacheco and Salak-Johnson, 2016). Queste situazioni di malessere si rendono evidenti soprattutto con un numero elevato di aggressioni protratto nel tempo, da una difficoltà da parte delle scrofe subordinate di utilizzare la mangiatoia e da un aumento del tempo trascorso in stazione da parte degli animali stabulati in gruppo. Dal punto di vista fisiologico uno stimo stressante prolungato nel tempo porta ad un innalzamento dei livelli di corticosteroidi che si traduce in un peggioramento delle performance riproduttive con mancato attecchimento degli embrioni, aumento dei feti mummificati e aumento del numero di suinetti nati morti (Soede et al., 2006, 2007; Turner et al., 2005; Turner et al., 2006). Lo scopo del presente studio è quello di verificare l'effetto della numerosità del gruppo di imbrancamento sull'aggressività e sugli esiti di tali comportamenti in termini di lesioni e sulle performance riproduttive.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto in un'azienda suinicola situata in provincia di Treviso nei mesi di novembre e dicembre 2022. L'allevamento preso in considerazione è organizzato a ciclo aperto, con bande settimanali e le scrofe vengono messe in gruppo 4 settimane dopo la fecondazione. L'indagine ha coinvolto un campione di 128 scrofe gravide e pluripare, di razza Large White suddivise in 4 bande (32 scrofe per banda). La conferma dello stato di gravidanza è stata eseguita ecograficamente prima del trasferimento nei box di gruppo. Alla 4 settimana post-inseminazione le scrofe prese in esame sono state suddivise in 3 box di gruppo così costituiti:

- 1 box da 16 scrofe, a mangiatoia libera con 1 stallo di protezione (chiamato "box 16")
- 1 box da 8 scrofe, a mangiatoia libera con 2 stalli di protezione (chiamato "box 8a")
- 1 box da 8 scrofe, a mangiatoia libera con 1 stallo di protezione (chiamato "box 8b").

Lo stallo di protezione è un recinto che permette l'accesso di una sola scrofa alla volta con la possibilità di accesso alla mangiatoia. L'introduzione di questo mini-box è stata pensata come zona di protezione per le scrofe subordinate o più reticenti ad avvicinarsi alla mangiatoia.
Le scrofe nelle diverse tesi avevano a disposizione la medesima superficie per capo (2,5 m^2) mentre quello che variava era la dimensione dei box in modo da poter accogliere rispettivamente 8 o 16 scrofe. A tal proposito il box da 16 scrofe è stato ricavato dall'unione di 2 box da 8 scrofe contigui. Al fine di ridurre la durata degli inseguimenti durante i comportamenti di lotta sono state posizionate 2 barriere all'interno del box da 16 scrofe, mentre in tutti e 3 i box erano presenti barriere divisorie sul fronte mangiatoia per permettere a tutte le scrofe di alimentarsi contemporaneamente.

Le osservazioni sono state fatte per 7 giorni dal momento dell'imbrancamento utilizzando delle telecamere installate al di sopra della mangiatoria in modo da permettere la visione dell'intero box. Le osservazioni sono state svolte seguendo gli orari sotto riportati scelti in base alla maggior attività delle scrofe, per un totale di 4 ore e 30 minuti al giorno:

- giorno 0 (giorno dell'imbrancamento): dal momento dell'imbrancamento per le successive 2 ore.
- dal giorno 1 al giorno 6: dalle ore 6:30 alle ore 9:00 e dalle ore 14:00 alle ore 16:00
- giorno 7: dalle ore 6:30 alle ore 9:00.

Figura 1: visione dall'alto del box da 16 scrofe. Nell'angolo in basso a destra è presente lo stallo di protezione, a ridosso del fronte mangiatoia sono presenti i divisori e le barriere fisiche.
Figure 1: top view of box 16. In the right corner there is one individual stall, to the front of the feeder there are the dividers and the physical barriers.

Figura 2: visione dall'alto dei box contenenti 8 scrofe. A sinistra il box con 2 stalli di protezione (box 8a) e a destra il box con 1 solo stallo di protezione (box 8b).
Figure 2: top view of box 8a (left) and box 8b (right). The left box has 2 individual stalls and the right box has 1 individual stall.
Per la raccolta dei dati sono stati utilizzati due modelli differenti in quanto sono state fatte

osservazioni in continuo per rilevare il numero di morsicature/ora e osservazioni ad intervalli di 15 minuti per la raccolta dei dati comportamentali.
I dati comportamentali registrati sono stati: n° scrofe in mangiatoia, n° stalli di protezione occupati, n° scrofe in stazione, n° scrofe in decubito e occupazione degli stalli di protezione. I parametri riproduttivi rilevati al parto sono: parto/aborto, durata della gestazione (in giorni), n° suinetti nati vivi, n° suinetti nati morti, n° suinetti mummificati e n° suinetti morti allo svezzamento.

I dati raccolti sono poi stati analizzati: relativamente alle morsicature è stata fatta l'analisi della varianza sul numero di morsi/capo, i dati espressi in percentuale (occupazione degli stalli di protezione, percentuale di scrofe in mangiatoia e percentuale di scrofe in stazione) sono stati analizzati con il test χ^2 (k-proportion test). Per quanto riguarda i dati sulle performance riproduttive (durata della gestazione e numero di suinetti nati vivi) sono stati espressi come medie stimate e analizzati tramite l'analisi della varianza. Il numero di suinetti nati morti, mummificati e morti prima dello svezzamento sono stati analizzati con il test di Krusal-Wallis.

RISULTATI
I dati relativi alle morsicature evidenziano valori medi di morsicatura/capo/giorno più elevati nelle bande stabulate nel box da 16 scrofe rispetto ai gruppi stabulati nei box da 8 scrofe (Grafico 1). L'assenza di differenze tra box 8a e 8b sembra indicare come la presenza di 2 minibox di protezione anziché 1 sia ininfluente rispetto ad un comportamento aggressivo come la morsicatura. Inoltre valori medi di morsicature osservati mettono in evidenza un andamento decrescente all'aumentare dei giorni di imbrancamento (Grafico 2) e questo conferma una progressiva stabilizzazione della gerarchia. In particolare il giorno dell'imbrancamento si registra un livello elevato di comportamenti di morsicatura, dal girono successivo fino al giorno 4 assistiamo ad una fase con valori altalenanti sintomo di una gerarchia sociale non completamente stabilita. In fine nella terza fase, dal quinto giorno dall'imbrancamento, osserviamo un andamento decrescente con valori di morsicatura dimezzati rispetto alla fase precedente e con comportamenti aggressivi notevolmente ridotti rispetto al giorno dell'imbrancamento.

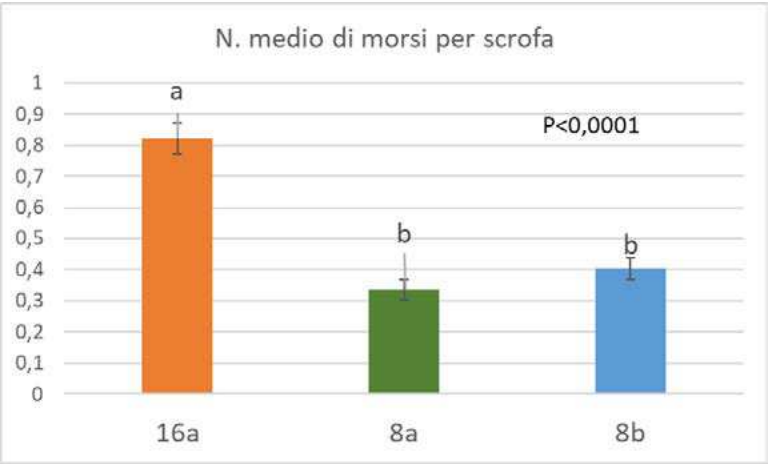


Grafico 1: n. medio di comportamenti di morsicatura per scrofa in funzione della numerosità del gruppo (lettere diverse tra le colonne indicano differenze statisticamente significative per P<0,0001).
Graph 1: average biting behaviour per sow divided for each box (different column letters stand for statistical differences for P<0,0001).

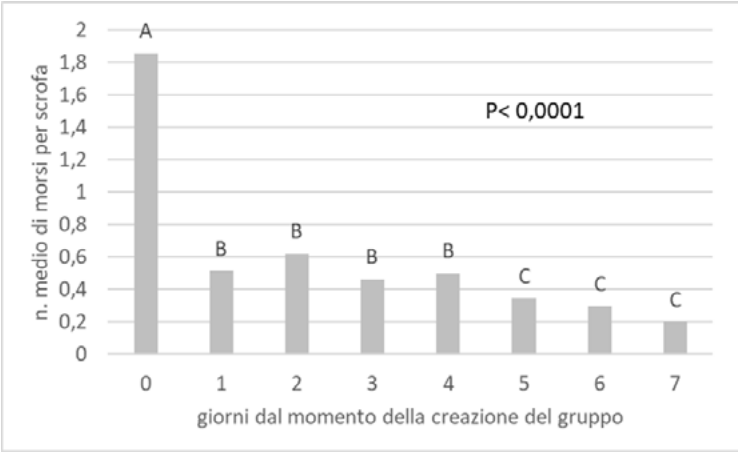


Grafico 2: n. medio di comportamenti di morsicatura per capo a diversi giorni dal momento dell'imbrancamento (lettere diverse tra le colonne indicano differenze statisticamente significative per P<0,0001).
Graph 2: average biting behaviour per sow divided for each box for each day from the housing day (different column letters stand for statistical differences for P<0,0001).

L'analisi dei dati relativi al numero di soggetti in stazione (Grafico 3) ha permesso di rilevare un effetto da parte della numerosità del gruppo di imbrancamento al variare del tempo (P=0,032). In particolare le bande stabulate nel box da 16 scrofe hanno evidenziato una prevalenza più bassa di soggetti in stazione rispetto alle bande stabulate nei box da 8 scrofe. Inoltre questi ultimi hanno mostrato un andamento simile facendo intendere che ci sia un effetto a carico della numerosità del gruppo. I valori di probabilità relativi al settimo giorno dall'imbrancamento sono significativamente più alti perché la rilevazione dei dati è avvenuta solamente al mattino (le bande venivano trasferite in box senza telecamera nel pomeriggio) risentendo in questo modo della fase di distribuzione dell'alimento.

Grafico 3: percentuale dei soggetti in stazione nei diversi giorni di osservazione.
Graph 3: percentage of sows in standing position for each day of observation.

L'analisi dei dati relativi al numero di soggetti in mangiatoia (Grafico 4) non ha mostrato un effetto attribuibile alla numerosità del gruppo di imbrancamento in quanto all'interno dei tre box non si sono evidenziate differenze significative. Allo stesso modo non si è registrato un effetto a carico del tempo trascorso dal momento dell'imbrancamento.

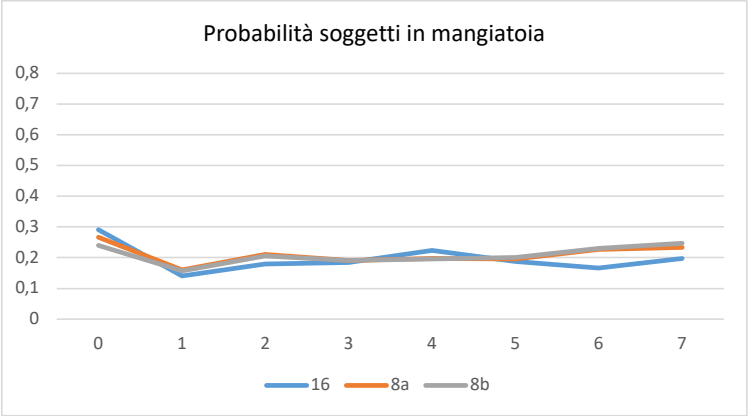


Grafico 4: occupazione della mangiatoia al variare dei giorni di imbrancamento.
Graph 4: occupancy of the feeder for each day of observation.

Al fine di determinare se la numerosità dei gruppi avesse un effetto sull'utilizzo degli stalli di protezione è stata calcolata la percentuale di utilizzo degli stessi nei casi in cui non ci fosse la presenza di altre scrofe in mangiatoia. In questo caso infatti lo "stallo" non veniva utilizzato dalle scrofe per alimentarsi ma prevalentemente per riposare in un'area riparata. Dai dati raccolti (Grafico 5) si è evidenziato che i box con un solo stallo di protezione (box "16" e box "8b") hanno riportato valori simili pur in presenza di una diversa numerosità dei gruppi, mentre il box al cui interno erano presenti 2 stalli di protezione (box 8a) ha registrato una frequenza maggiore di utilizzo.

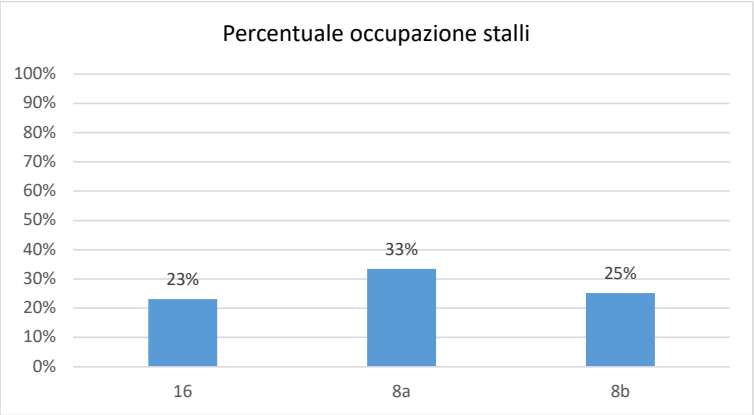


Grafico 5: percentuale di occupazione degli stalli di protezione in base al gruppo di imbrancamento.
Graph 5: percentage of occupation of the individual stalls for each housing group.

I dati relativi agli aborti registrati durante la fase di gestazione in gruppo (Grafico 6) hanno evidenziato un'incidenza inferiore nelle bande stabulate nel box da 16 scrofe, mentre le bande stabulate nei box da 8 scrofe hanno registrato lo stesso numero di aborti.

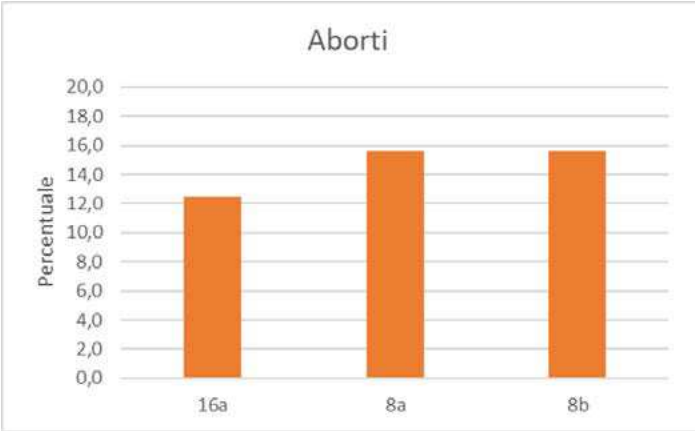


Grafico 6: incidenza aborti per gruppo di stabulazione, valori percentuali.
Graph 6: percentage of abortion for each group

I dati relativi alle performance riproduttive (Tabella 1) sono stati analizzati attraverso due modelli statistici differenti al fine di individuare l'effetto del gruppo di imbrancamento sulle performance riproduttive. In particolare è stato individuato un effetto tesi significativo a carico della durata della gestazione e del numero di suinetti nati morti. L'effetto individuato è risultato significativo ma di minore entità per la durata della gestazione (P=0,014), mentre per il numero di suinetti nati morti si è individuato un effetto tesi più rilevante (P=0,001).

	Tesi			P
	16a	**8a**	**8b**	
Durata gestazione	116±0.16a	115±0.26b	116±0.25a	0,014
Nati vivi	13±0.43	13±0.67	13±0.66	0,956
Nati morti	1(0-4)b	2(0-9)a	1(0-14)a	0,001
Mummificati	0(0-2)	0(0-2)	0(0-2)	0,381
Morti	1(0-6)	2(0-6)	1(0-6)	0,679

Tabella 1: confronto tra i parametri riproduttivi del parto corrente presi in esame. I dati relativi alla durata della gestazione e al numero di suinetti nati vivi sono espressi come medie stimate ± errore standard. I dati relativi al numero di suinetti nati morti, al numero di suinetti mummificati e al numero di suinetti morti prima dello svezzamento sono riportati come mediana (range).
Table 1: reproductive performances for each housing group. The pregnancy length and the number of piglets born alive are expressed as estimated average ± SE. The number of stillborn piglets, mummified piglets and dead before weaning are expressed as a range.

DISCUSSIONE

I dati raccolti nel presente studio hanno permesso di valutare come la numerosità del gruppo di imbrancamento abbia influenzato alcuni parametri comportamentali e di performance al parto. Il numero medio di morsicature registrato è più alto per i gruppi stabulati nel box da 16 scrofe, questo è imputabile principalmente ad un numero maggiore soggetti e quindi ad un numero maggiore di interazioni per stabilire la gerarchia nel gruppo. Tra i gruppi da 8 scrofe non si sono registrate differenze statisticamente significative relativamente al numero di morsicature osservato. L'andamento delle morsicature al variare dei giorni dall'imbrancamento ha mostrato principalmente 3 fasi che riflettono la formazione della gerarchia all'interno dei gruppi. La durata della fase di stabilizzazione della gerarchia (fase "B" nel Grafico 2) è particolarmente importante per limitare il numero delle aggressioni e l'obiettivo dovrebbe essere quello di ridurre il più possibile la durata di questa fase.
Relativamente all'occupazione degli stalli di protezione notiamo che nei box con un solo stallo di protezione (box 16 e box 8b) la percentuale è simile mentre la percentuale di utilizzo maggiore si è registrata nel box con 2 stalli (box 8a). Interessante è il dato relativo al box 16 perché nonostante ci sia un numero maggiore di soggetti la percentuale di utilizzo non è molto diversa dal box 8b, questo suggerisce che l'impiego delle barriere fisiche sia utile a garantire uno spazio di protezione durante i comportamenti di aggressione Inoltre il nostro studio ha permesso di evidenziare un effetto da parte degli stalli di protezione nel ridurre il numero di morsicature perché nei gruppi con un utilizzo maggiore degli stalli (Grafico 5) si è registrato anche il numero medio di morsicature per scrofa più basso (Grafico 1).

Analizzando i dati sulle performance riproduttive ci accorgiamo che la percentuale di aborti maggiore si è registrata nei gruppi stabulati nei box da 8 scrofe mentre i gruppi da 16 hanno registrato una percentuale inferiore. Quindi avremo una portata al parto superiore nei gruppi a maggiore numerosità.
L'effetto della numerosità del gruppo di imbrancamento sulle performance al parto si è reso evidente anche sulla durata della gestazione che è risultata inferiore nei gruppi da 8 scrofe e sul numero di suinetti nati morti che è risultato superiore nei gruppi da 8 scrofe. Il numero di morsicature più elevato registrato nei gruppi da 16 scrofe non ha causato un peggioramento delle performance riproduttive suggerendo che le morsicature vengano osservate prevalentemente nel periodo di formazione della scala gerarchica e quindi non costituiscano un fattore di discomfort prolungato nel periodo di stabulazione in gruppo.

Se prendiamo come indicatore di discomfort all'interno dei gruppi la percentuale di soggetti in stazione ci accorgiamo che i gruppi da 16 scrofe hanno registrato valori inferiori rispetto ai gruppi da 8. Confrontando questo dato con le performance al parto notiamo che i gruppi da 16 hanno registrato una portata al parto maggiore mentre i gruppi da 8 hanno registrato una durata della gestazione inferiore e un numero di suinetti nati morti superiore. Questo dato è spiegabile dal fatto che quando parte del gruppo è in decubito (ricordiamo che le scrofe tendono a distendersi lungo il perimetro del box) ci sarà un aumento dello spazio a disposizione delle scrofe in stazione. In questo modo noteremo un aumento che possiamo definire relativo della superficie a diposizione di ciascun capo che permetterà anche di aumentare le possibilità di evitamento e di fuga durante i comportamenti di aggressione. In questo modo nonostante il numero di morsicature osservato sia risultato superiore, le condizioni di benessere delle scrofe stabulate nei gruppi da 16 capi sono risultate migliori. Diversi autori hanno dimostrato un aumento dell'aggressività e dello stress nel gruppo al diminuire dello spazio di stabulazione (Barnett et al., 2001; Docking et al., 2000; Verdon

et al., 2015; Weng et al, 1998), pertanto possiamo ipotizzare che nel corso della giornata i gruppi da 8 scrofe siano più soggetti a questo tipo di fenomeno.

Per quanto riguarda l'utilizzo della mangiatoia non si sono registrate differenze a carico della numerosità del gruppo di imbrancamento e nemmeno un effetto a carico del tempo trascorso dalla formazione dei gruppi. Queste osservazioni possono essere indice del fatto che la tipologia di mangiatoia utilizzata dall'azienda (mangiatoia ad accesso libero) sia un buon compromesso per permettere l'accesso alla mangiatoia anche alle scrofe subordinate.

CONCLUSIONI

Dai risultati di questo studio possiamo concludere che la stabulazione in gruppi più numerosi mantenendo invariata la superficie/capo ha portato ad un aumento del benessere in gestazione e a un miglioramento delle performance al parto, evidente soprattutto sulla portata al parto. L'utilizzo di stalli di protezione e barriere fisiche si è rivelata una misura efficace per ridurre il numero e la durata dei comportamenti di aggressione.
Alcune delle soluzioni che si sono dimostrate efficaci in letteratura per ridurre le interazioni aggressive al momento dell'imbrancamento comprendono la formazione di gruppi con scrofe imbrancate assieme in precedenza e la formazione dei gruppi nelle ore serali quando si registra una minore attività delle scrofe.
Inoltre, come illustrato in precedenza, la formazione della gerarchia del gruppo è limitata alla prima settimana dall'imbrancamento e quindi risulta di fondamentale importanza l'utilizzo di arricchimenti ambientali per garantire il benessere durante il restante periodo di gestazione e consentire al meglio la corretta espressione del pattern etologico della specie.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia riferita al solo testo citato.

1. Barnett, J. L., Hemsworth, P. H., Cronin, G. M., Jongman, E. C., & Hutson, G. D. (2001). A review of the welfare issues for sows and piglets in relation to housing. Australian Journal of Agricultural Research, 52, 1–28.
2. DECRETO LEGISLATIVO 7 luglio 2011, n. 122. Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini.
3. https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2011-08-02&atto.codiceRedazionale=011G0164&elenco30giorni=false
4. Direttiva 2008/120/CE del Consiglio, del 18 dicembre 2008, che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini
5. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32008L0120
6. Docking C. M., Kay R. M., Whittaker X., Burfoot A., Day J. E. L. (2000). The effects of stocking density and pen shape on the behaviour, incidence of aggression and subsequent skin damage of sows mixed in a specialised mixing pen. Proceedings of the British Society of Animal Science, Scarborough, UK.
7. Pacheco E. (2015). Assessing the well-being of gestating submissive sows in group pens using multiple welfare metrics. Thesis: University of Illinois, Urbana, IL.
8. Pacheco E., Salak-Johnson, J. L. (2016). Social status affects welfare metrics of group-housed gestating sows. Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry, 1, 103–110.
9. Soede, N. M., Roelofs, J. B., Verheijen, R. J. E., Schotuen, W. P. G., Hazeleger, W., & Kemp, B. (2007). Effect of repeated stress treatments during the follicular phase and early pregnancy on reproductive performance of gilts. Reproduction in Domestic Animals, 42, 135–142.

10. Soede, N. M., van Sleuwen, M. J. W., Molenaar, R., Rietveld, F. R., Schotuen, W. P. G., Hazeleger, W., & Kemp, B. (2006). Influence of repeated regrouping on reproduction in gilts. Animal Reproduction Science, 96, 133–145.
11. Turner, A. I., Hemsworth, P. H., & Tilbrook, A. J. (2005). Susceptibility of reproduction in female pigs to impairment by stress or elevation of cortisol. Domestic Animal Endocrinology, 29, 398–410.
12. Turner, A. I., Tilbrook, A. J., (2006). Stress, cortisol, and reproduction in female pigs. In: A. J. Ashworth, & P. R. Kraeling (Eds.), Control of pig reproduction VII (pp. 191–204). Nottingham University Press.
13. Verdon, M., Hansen, C. F., Rault, J.-L., Jongman, E., Hansen, L. U., Plush, K., & Hemsworth, P. H. (2015). Effects of group housing on sow welfare: A review. Journal of Animal Science, 93, 1999–2017.
14. Weng, R. C., Edwards, S. A., & English, P. R. (1998). Behaviour, social interactions and lesion scores of group housed sows in relation to floor space allowance. Applied Animal Behaviour Science, 59, 3017–3316.

USO DEGLI ARRICCHIMENTI AMBIENTALI COME MEZZO DI RIDUZIONE DI COMPORTAMENTI ANOMALI E LESIONI TRA SUINI NON CAUDECTOMIZZATI NELL'ALLEVAMENTO ALL'INGRASSO ITALIANO

USE OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENTS TO REDUCE ABNORMAL BEHAVIOURS AND INJURIES IN UNDOCKED PIGS WITHIN THE ITALIAN FATTENING SYSTEM

FAVARO D.[1], CONTIERO B.[1], GOTTARDO F.[1], SCOLLO A.[2], TONON F.[1,3]

[1]Dipartimento MAPS, Università di Padova, Legnaro (PD);
[2]Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO);
[3]Suivet, Via Madonna della Salute 9, S. Vendemiano (TV).

Parole chiave: suino all'ingrasso, morsicatura della coda, benessere animale
Keywords: fattening pig, tail biting, animal welfare

Riassunto
Nell'allevamento suino, la caudofagia è un comportamento problematico con gravi impatti sul benessere animale. La controversa pratica della caudectomia, spesso adottata per prevenire la caudofagia, richiede interventi di accompagnamento degli allevatori per essere abbandonata, e per essere conformi alla normativa vigente. Studi indicano che l'inserimento nei box di arricchimenti ambientali, in particolare la paglia, migliora il benessere del suino, riducendo comportamenti dannosi come la morsicatura e le conseguenti lesioni. Questo lavoro valuta l'efficacia di due arricchimenti (paglia e tronchetto di legno) e l'effetto della densità di gruppo, durante la fase d'ingrasso, in un allevamento mantovano. I dati, ottenuti osservando i comportamenti e le lesioni alla coda, indicano che la paglia favorisce comportamenti positivi e riduce quelli anomali. Al contempo, una maggiore disponibilità di spazio migliora il comfort degli animali. L'età degli animali influisce sui comportamenti, con una diminuzione dell'aggressività e lesioni alla coda all'aumentare di questa. In sintesi, l'adozione di arricchimenti ambientali realmente efficaci, soprattutto nei suini giovani (4 mesi), unitamente alla gestione adeguata dello spazio e all'attenzione verso gli altri fattori di rischio (soprattutto qualità dell'aria e tipo di pavimentazione) per la caudofagia, migliora le condizioni di vita dei suini allevati, rendendo il settore zootecnico più sostenibile e rispettoso del benessere animale.

Abstract
In pig industry, tail biting is a problematic behavior with serious impacts on animal welfare. The controversial practice of systematic tail docking, often adopted to prevent caudophagy, requires accompanying interventions for farmers to be abandoned, and to comply with current regulations. Studies indicate that the inclusion of environmental enrichments, particularly straw, in the pens improves pig welfare by reducing harmful behavior such as biting and subsequent injuries. This works evaluates the effectiveness of two environmental enrichments (straw and wooden log) and the effect of group density, during the fattening phase, in a pig farm located in the Mantova area. The data, obtained by observing behaviors and tail injuries, indicate that straw promotes positive behaviors and reduces abnormal ones. At the same time, increased space availability

improves animal comfort. The animals' age had an important bearing on the observed behavioral trends, in particular a reduction in aggression and consequently tail injuries was observed as the age of the animals increased. In summary, the adoption of effective environmental enrichment, especially in young pigs (4 months of age), together with appropriate space management and attention to other risk factors (especially air quality and floor type) for caudophagy, improves the living conditions of reared pigs, making the livestock sector more sustainable and respectful of animal welfare.

INTRODUZIONE

La pratica della caudectomia sistematica, eseguita nei suinetti entro pochi giorni dalla nascita, è vietata fin dalla direttiva 91/630/CEE. Il divieto, introdotto in Italia nel 1992 attraverso il d.lgs. 534, si è esteso a tutta l'UE nel 1994. Nel tempo, alcuni aspetti sono stati parzialmente modificati tramite tre direttive, ma una revisione sostanziale è stata adottata nel 2008 con la direttiva 120/2008/CE, recepita in Italia con il d.lgs. 122/2011. Questo ribadisce il divieto, sottolineando la necessità di modificare le condizioni ambientali o i sistemi di gestione per ridurre il rischio caudofagico e altri comportamenti anomali. Inoltre, specifica che la caudectomia non deve essere una pratica di routine e può essere effettuata solo in presenza di ferite alle code di altri suini. Prima di eseguire tale operazione, devono quindi essere adottate misure atte a prevenire le morsicature, considerando condizioni ambientali, sistemi di gestione e densità degli animali, attuando ove necessario adeguate modifiche (Allegato 1, Parte I, 9.). Nonostante siano trascorsi 30 anni dal divieto, la realtà negli allevamenti sembra discostarsi dagli obblighi normativi. Uno studio del 2018 ha rivelato che a livello europeo il 77% dei suini subisce il taglio della coda, con una percentuale che arriva al 94,5% in Italia [1]. D'altro canto, il comportamento caudofagico rimane un fenomeno complesso da comprendere appieno, e le ricerche scientifiche concordano sull'origine multifattoriale. Attualmente, sono stati identificati i principali fattori di rischio, e la recente Opinione Scientifica dell'EFSA [2] del 2022 ha raccomandato misure preventive o correttive per mitigare questa problematica. Studi indicano che l'inserimento nei box di arricchimenti ambientali, in particolare la paglia, migliora il benessere del suino, riducendo comportamenti come la morsicatura e le conseguenti lesioni [3–6]. L'obbiettivo di questo lavoro era quello di valutare l'effetto dell'arricchimento ambientale e dello spazio disponibile sul comportamento degli animali e sull'incidenza delle lesioni a coda e orecchie.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso un allevamento a ciclo chiuso dedicato alla produzione DOP del "Prosciutto di Parma" nella provincia di Mantova. Sono stati considerati 380 suini Goland all'ingrasso, non caudectomizzati. I suinetti, svezzati a 28 giorni, sono stati trasferiti alle strutture di post-svezzamento e successivamente a quelle d'ingrasso al raggiungimento di 45-55 kg e 12 settimane d'età. Le strutture erano dotate di sistemi di controllo automatico della temperatura (22°C nel primo mese e successivamente 20°C) e della ventilazione. La pavimentazione dei box era suddivisa tra pavimentazione piena nella metà adiacente al corridoio centrale e fessurata nella restante metà. Ogni recinto era provvisto di un punto di abbeverata con tazza. L'alimentazione liquida veniva somministrata tre volte al giorno attraverso un sistema computerizzato e seguiva una formulazione conforme ai requisiti della DOP. I suini sono stati suddivisi in gruppi in base all'arricchimento ambientale o alla densità di allevamento, e confrontati con un gruppo di controllo senza arricchimento.

I gruppi di trattamento comprendevano:
·Gruppo P: Rastrelliere con paglia (3 box).
·Gruppo T: Tronchetti di legno posti all'interno di tubi metallici fissati a parete (3 box).
·Gruppo N: Assenza di arricchimenti, densità al limite normativo (3 box).
·Gruppo D: Assenza di arricchimenti, densità inferiore al limite normativo (3 box).
Le osservazioni comportamentali sono state eseguite a 4, 6,5 e 9 mesi d'età degli animali. I contatti con l'arricchimento, il numero di animali distesi, le interazioni con i conspecifici e con l'ambiente sono stati registrati a intervalli regolari di 2 minuti (scan sampling), per un totale di 30 rilevamenti consecutivi in ciascuna sessione. I conflitti, i morsi alla coda, alle orecchie e i comportamenti di belly nosing sono stati monitorati per la totale durata dell'intervallo di scansione (2 minuti) e registrati come numero di eventi per intervallo di tempo, secondo la tecnica "behavior sampling". Al termine di ogni osservazione, è stata valutata la presenza di lesioni alle code registrando il numero di code danneggiate per box. Durante lo svolgimento dello studio, due avvenimenti hanno inciso significativamente sul disegno sperimentale originario. Nel mese di febbraio, tra la prima e la seconda rilevazione, si è verificato un focolaio di Diarrea Epidemica Suina (PED), causando una notevole mortalità tra gli animali. Per mantenere una densità inferiore e bilanciare il peso medio tra gli animali, l'allevatore ha deciso di ridistribuire alcuni suini, creando ulteriori 3 box a densità ridotta. Nonostante gli impatti negativi sulla salute animale, questo evento ha aperto una nuova prospettiva di studio, consentendo la formazione del gruppo "D". Tale gruppo ha permesso di indagare l'effetto della maggiore disponibilità di spazio per capo sui comportamenti oggetto di studio alla seconda e terza rilevazione. Tra la seconda e la terza rilevazione, una parte degli animali è stata inviata anticipatamente al macello, generando spazio aggiuntivo per alcuni gruppi. L'incremento della quantità di spazio disponibile per capo è stato del 45% nel gruppo "N" e del 33% nel gruppo "D". Questo incremento dovrebbe essere considerato in relazione all'aumento del peso degli animali, influenzando lo spazio effettivamente disponibile per capo; ciò nonostante, questa specifica relazione non è stata considerata nello studio. In ogni caso, a parità d'età, la quantità di spazio supplementare per capo nel gruppo "D", rispetto al gruppo "N", è stata del 5% nella seconda osservazione, salendo poi al 18% nella terza. Tuttavia, la presenza dell'evento epidemico e l'invio frazionato al macello prima della terza osservazione rendono necessaria l'esecuzione di ulteriori studi per correggere il disegno sperimentale e valutare l'effetto della densità in modo più accurato.

RISULTATI
I risultati sono di seguito riportati, in forma tabellare.

Tabella 1: Comportamenti e lesioni nei gruppi di trattamento in relazione all'effetto dell'arricchimento.
Table 1*: Behaviors and injuries in treatment groups in relation to the effect of enrichment.*

Parametri	**GT**	**Osservazione**			**Sem**	**P-values**		
Effetto dell'arricchimento		4 mesi	6,5 mesi	9 mesi		Tratt.	Mese	Tratt.*Mesi
Contatto diretto con l'arricchimento % per scan	P	7,93	3,86	2,17	1,14	ns	***	***
	T	4,18	3,53	4,62				
	N	-	-	-				
Contatto con l'arricchimento a terra % per scan	P	4,11	9,20	4,28	1,07	*	***	***
	T	0,84	2,24	1,59				
	N	-	-	-				
Contatto con l'arricchimento diretto e a terra % per scan	P	12,04	13,06	6,40	1,92	ns	***	***
	T	5,02	5,77	6,23				
	N	-	-	-				
Animali distesi % per scan	P	44,74	32,67	20,38	4,81	ns	***	***
	T	38,93	32,81	45,42				
	N	57,55	32,98	52,50				
Interazione con l'ambiente % per scan	P	18,43	14,58	25,14	2,79	ns	***	***
	T	22,37	14,53	13,50				
	N	15,49	11,35	10,95				
Interazione con i conspecifici % per scan	P	3,96	2,65	3,19	0,90	ns	***	***
	T	5,33	3,94	5,05				
	N	9,20	2,97	4,59				
Conflitti n. medio eventi/h	P	10,33	2,67	4,76	3,15	ns	ns	ns
	T	12,67	9,33	7,08				
	N	8,58	3,67	4,67				
Morsi alle orecchie n. medio eventi/h	P	2,00	4,33	1,92	2,44	ns	*	†
	T	5,00	2,67	0,97				
	N	21,89	1,33	1,41				
Morsi alla coda n. medio eventi/h	P	1,67	1,33	1,85	1,10	ns	ns	ns
	T	4,67	0,67	1,18				
	N	4,00	0,67	1,94				
Code con lesione % suini con lesione	P	17,76	0,00	0,00	3,85	ns	***	ns
	T	22,77	4,00	2,50				
	N	21,74	7,69	0,00				

ns=P>0,1; †:P≤0,10; *: P≤0,05; **:P≤0,01; ***:P≤0,001.

GT=gruppo di trattamento, P=rastrelliera con paglia, T=tronchetto, N=controllo,
Sem=errore standard della media, Tratt.=tipo di arricchimento, Tratt.*Mesi=interazione trattamento per mese.
GT=treatment group, P=straw rack, T=wooden log, N=control,
*Sem=standard error of the mean, Tratt.=enrichment type, Tratt.*Mesi=treatment by month interaction.*

Tabella 2: Comportamenti e lesioni nei gruppi di trattamento in relazione alla densità d'allevamento.
***Table 2**: Behaviors and injuries in treatment groups in relation to rearing density.*

Parametri	**GT**	**Osservazione**		**Sem**	**P-values**		
Effetto della densità d'allevamento		6,5 mesi	9 mesi		Tratt.	Mesi	Tratt.*Mesi
Animali distesi % per scan	D N	26,60 32,98	70,00 50,22	7,37	ns	***	***
Interazione con l'ambiente % per scan	D N	13,90 11,35	11,24 10,77	1,27	ns	ns	ns
Interazione con i conspecifici % per scan	D N	3,23 2,97	3,79 3,66	0,62	ns	ns	ns
Conflitti n. medio eventi/h	D N	2,33 5,00	3,67 6,50	2,33	ns	ns	ns
Morsi alle orecchie n. medio eventi/h	D N	0,33 2,33	1,67 1,03	0,97	ns	ns	ns
Morsi alla coda n. medio eventi/h	D N	0,67 0,67	2,33 1,51	0,64	ns	ns	ns
Code con lesione % suini con lesione	D N	2,70 7,69	0,00 0,00	2,42	ns	ns	ns

ns=P>0,1; ***:P≤0,001.
GT=gruppo di trattamento, D=bassa densità, N=densità normale,
Sem=errore standard della media, Tratt.=densità, Tratt.*Mesi=interazione trattamento per mese.
GT=treatment group, D=low density, N=normal density,
*Sem=standard error of the mean, Tratt.=density, Tratt.*Mesi=treatment by month interaction.*

Il comportamento di belly nosing ha dato risultati significativi esclusivamente per quanto riguarda l'effetto età degli animali (P=0,0115) con un andamento rappresentato come % eventi/giornata pari a 0,46 (4 mesi), 0,35 (6,5 mesi) e <0,01 (9 mesi).

DISCUSSIONE

L'analisi dei contatti diretti con l'arricchimento rivela un interesse maggiore per la paglia rispetto al tronchetto. Tuttavia, l'assenza di differenze a 9 mesi potrebbe essere attribuita alla possibile carenza di paglia nelle rastrelliere in quella specifica osservazione. Confrontando i contatti a terra con l'arricchimento, emerge una differenza del 4% a favore della paglia. Questo risultato sarebbe spiegato dal fatto che la paglia si sfalda e si disperde nell'ambiente più facilmente rispetto al tronchetto, che richiede manipolazioni orali più estese. I gruppi con l'arricchimento hanno dedicato più tempo all'esplorazione e alle attività rispetto al gruppo "N", riducendo così il tempo dedicato al riposo. Questo risultato, in linea con studi precedenti [7], conferma l'effetto positivo dell'arricchimento sul benessere. Riguardo all'effetto densità, si osserva un aumento di animali distesi in entrambi i gruppi tra le due giornate, attribuibile all'incremento dello spazio per capo a seguito dell'invio frazionato al macello. La comparazione tra gruppi nelle singole giornate evidenzia un aumento significativo di animali distesi per il gruppo "D" rispetto ad "N" solo a 9 mesi. Questo potrebbe essere legato alla quantità di spazio supplementare per capo per "D", che in tale osservazione era del 18%, mentre nella precedente era solo del 5%. I risultati indicano anche che gli animali senza arricchimento manifestano meno comportamenti positivi, come l'esplorazione dell'ambiente, e si concentrano maggiormente su comportamenti dannosi, come l'interazione e la manipolazione dei conspecifici. Questi comportamenti possono derivare dalla necessità esplorativa dell'animale, che, non potendo essere soddisfatta adeguatamente data la mancanza di stimoli esterni [8], viene reindirizzata verso i compagni di box [9]. La paglia risulta essere il

miglior arricchimento nella riduzione delle interazioni con i conspecifici, soddisfacendo meglio il bisogno di esplorazione e manipolazione. Al contrario, il tronchetto, essendo un materiale di arricchimento puntiforme, consente l'accesso a un numero limitato di animali [10], aumentando potenzialmente le interazioni con i conspecifici. La natura puntiforme del tronchetto potrebbe inoltre essere motivo di conflitti [10]; tuttavia, la mancanza di risultati significativi in tal senso non conferma questo assunto. L'analisi delle interazioni con i conspecifici e dei morsi alle orecchie mostra una maggiore incidenza a 4 mesi, possibilmente associata alla mancanza di autocontrollo negli animali giovani [11] e alla necessità di stabilire una gerarchia nel nuovo gruppo creato per la fase d'ingrasso [2]. Allo stesso tempo, durante la prima osservazione, è evidente come nei gruppi "P" e "T" gli arricchimenti siano risultati efficaci nel ridurre i morsi alle orecchie, risultato coerente con uno studio precedente [12]. Alla prima osservazione, quando gli animali avevano 4 mesi, i morsi alla coda tendono ad essere inferiori nel gruppo "P" rispetto al gruppo "T" e "N"; tuttavia, l'assenza di significatività statistica non ci consente di trarre una conclusione definitiva. La progressiva diminuzione del comportamento di belly nosing lungo lo studio è legata alla crescita degli animali [2], mentre la bassissima incidenza, sempre inferiore allo 0,5%, è attribuibile al buon protocollo di svezzamento e al rispetto dei 28 giorni d'età dei suinetti. Per quanto riguarda le lesioni alla coda, nonostante la non significatività sull'effetto degli arricchimenti, la paglia si distingue per avere la percentuale più bassa, raggiungendo addirittura lo 0% già dalla seconda osservazione. La riduzione pressoché netta delle lesioni in tutti i gruppi, nella terza osservazione, potrebbe essere attribuita sia all'incremento dello spazio disponibile per gli animali, derivante dall'invio frazionato al macello di parte di essi, sia al maggiore autocontrollo manifestato dagli animali più anziani. Questo autocontrollo porterebbe a una minore espressione di comportamenti dannosi [11], come anche evidenziato in precedenza dalle analisi sulle interazioni con i conspecifici, i morsi alle orecchie e il comportamento di belly nosing.

CONCLUSIONI

Lo studio evidenzia che l'implementazione di arricchimenti mirati, unitamente alla corretta gestione dello spazio, può apportare notevoli miglioramenti alle condizioni di vita dei suini allevati. La paglia si è dimostrata un arricchimento efficace, anche quando utilizzata nelle rastrelliere, a condizione che venga fornita in quantità adeguate. Questa ha ridotto i comportamenti dannosi, come il morso alle orecchie, e promosso i comportamenti positivi, come l'esplorazione. Nonostante l'assenza di risultati significativi nella riduzione della caudofagia, la paglia ha annullato le lesioni alla coda nelle ultime due osservazioni, indicando un impatto positivo sulla salute generale degli animali. L'utilizzo di paglia nelle rastrelliere potrebbe quindi risultare particolarmente benefico per gli animali allevati su pavimentazioni fessurate. La preferenza dei suini per questo arricchimento rispetto al tronchetto dovrebbe essere considerata nelle pratiche di allevamento. Gli allevatori dovrebbero dunque prediligere arricchimenti ambientali efficaci a promuovere comportamenti positivi specifici dell'animale. L'età degli animali è risultata essere un fattore significativo per i comportamenti dannosi e le lesioni alla coda, con una maggiore incidenza nei suini giovani. Ciò potrebbe essere attribuito alla maggiore necessità di manifestare comportamenti esplorativi, stabilire gerarchie nei nuovi gruppi e alla mancanza di autocontrollo. Pertanto, l'uso preventivo di arricchimenti ambientali efficaci assume un'importanza fondamentale, soprattutto durante la giovane età dei suini. Infine, anche se il disegno sperimentale sarebbe da definire meglio con studi più accurati, l'aumento dello spazio minimo disponibile per capo è risultato correlato a una maggiore percentuale di suini distesi. Questo sottolinea l'importanza di una gestione attenta dello spazio negli allevamenti, suggerendo la possibilità di ridurre, se necessario, il numero di animali allevati al fine di migliorarne il loro comfort complessivo. A livello legislativo, sarebbe necessaria

una revisione degli spazi minimi per capo per gli animali più pesanti, così da migliorare la realtà del suino pesante italiano. La crescente consapevolezza degli impatti negativi della caudectomia, unita alla sua esecuzione sistematica nella maggior parte degli allevamenti nonostante il divieto legislativo, evidenzia la necessità di sistemi di controllo più stringenti e azioni di accompagnamento che scoraggino questa pratica. La legislazione dovrebbe adeguarsi alle nuove scoperte scientifiche, promuovendo l'uso di arricchimenti ambientali efficaci e adatti alle diverse situazioni strutturali, sostenendo gli allevatori in questo processo. Migliorare le condizioni d'allevamento per i suini al fine di ridurre la caudofagia significa migliorare la salute ed il benessere degli animali e, al contempo, migliorare la reputazione dell'intero settore suinicolo.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia integrale nel file completo.

1. De Briyne N, Berg C, Blaha T, Palzer A, Temple D (2018) "Phasing out pig tail docking in the EU - present state, challenges and possibilities". *Porc Heal Manag*. 4(1), 1-9. doi:10.1186/s40813-018-0103-8
2. EFSA, Nielsen SS, Alvarez J, et al. (2022) "Welfare of pigs on farm". *EFSA J*. 20(8), 319. doi:10.2903/j.efsa.2022.7421
3. EFSA (2007) "The risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare". *EFSA J*. 5(12), 611. doi:10.2903/j.efsa.2007.611
4. Godyń D, Nowicki J, Herbut P (2019) "Effects of Environmental Enrichment on Pig Welfare—A Review". *Animals*. 9(6), 383. doi:10.3390/ani9060383
5. Van de Weerd H, Day JEL (2009) "A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems". *Appl Anim Behav Sci*. 116(1), 1-20. doi:10.1016/j.applanim.2008.08.001
6. D'Eath RB, Arnott G, Turner SP, et al. (2014) "Injurious tail biting in pigs: how can it be controlled in existing systems without tail docking?". *Animal*. 8(9), 1479-1497. doi:10.1017/S1751731114001359
7. Machado SP, Caldara FR, Foppa L, et al. (2017) "Behavior of pigs reared in enriched environment: Alternatives to extend pigs attention". Palagi E, ed. *PLoS One*. 12(1), 18. doi:10.1371/journal.pone.0168427
8. Tarou LR, Bashaw MJ (2007) "Maximizing the effectiveness of environmental enrichment: Suggestions from the experimental analysis of behavior". *Appl Anim Behav Sci*. 102(3-4), 189-204. doi:10.1016/J.APPLANIM.2006.05.026
9. Pedersen LJ, Herskin MS, Forkman B, Halekoh U, Kristensen KM, Jensen MB (2014) "How much is enough? The amount of straw necessary to satisfy pigs' need to perform exploratory behaviour". *Appl Anim Behav Sci*. 160(1), 46-55. doi:10.1016/J.APPLANIM.2014.08.008
10. Van de Weerd H, Docking CM, Day JEL, Breuer K, Edwards SA (2006) "Effects of species-relevant environmental enrichment on the behaviour and productivity of finishing pigs". *Appl Anim Behav Sci*. 99(3-4), 230-247. doi:10.1016/j.applanim.2005.10.014
11. Krause A, Kreiser M, Puppe B, Tuchscherer A, Düpjan S (2021) "The effect of age on discrimination learning and self-control in a marshmallow test for pigs". *Sci Rep*. 11(1), 18287. doi:10.1038/s41598-021-97770-x
12. Telkänranta H, Bracke MBM, Valros A (2014) "Fresh wood reduces tail and ear biting and increases exploratory behaviour in finishing pigs". *Appl Anim Behav Sci*. 161(1), 51-59. doi:10.1016/J.APPLANIM.2014.09.007

INQUADRAMENTO EPIDEMIOLOGICO DELLA PESTE SUINA AFRICANA: NUOVO PERICOLO SANITARIO

EPIDEMIOLOGICAL FRAMEWORK OF AFRICAN SWINE FEVER: NEW HEALTH HAZARD

TEDESCHI I.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Parma

Parole chiave: Peste Suina Africana; Virus; Epidemiologia
Keywords: African Swine Fever; Virus; Epidemiology

Riassunto
L'allevamento suinicolo e i prodotti da esso derivati rappresentano una parte fondamentale, e per alcuni paesi maggioritaria, del mercato delle produzioni animali mondiale, oltre che un profondo legame con le tradizioni e le culture dei vari paesi, che da sempre praticano questo tipo di allevamento. L'Italia, in Europa, è il paese con la maggior produzione di salumi a marchio DOP (Denominazione di Origine Protetta) e molteplici prodotti freschi ne testimoniano il legame antico con questo animale. La peste suina africana (PSA) è una malattia virale, che rappresenta attualmente uno dei principali problemi sanitari che affliggono l'allevamento e l'industria suinicola di tutto il mondo. In Europa è caratterizzata da un ciclo domestico, che coinvolge i suini e da un ciclo silvestre che interessa i cinghiali, mentre nel continente africano colpisce diverse specie di suidi selvatici. Questo virus presenta numerose insidie ed elementi di estrema particolarità, dovuti alla sua struttura e alla sua capacità di evadere il sistema immunitario. Caratteristiche queste che lo rendono unico nel suo genere, rappresentando, di fatto, una nuova sfida per i medici veterinari e per gli allevatori. Questo elaborato di tesi ha lo scopo di offrire una panoramica completa di quella che è la situazione epidemiologica mondiale, con una certa attenzione al continente Africano, ma soprattutto intende fare chiarezza sulla situazione nazionale, a partire dalla più recente introduzione di PSA, oltre che, fornire una descrizione accurata della patologia nelle sue differenti manifestazioni cliniche.

Abstract
Pig farming and the products derived represent a fundamental part, and for some countries the majority, of the world animal production market, as well as a deep link with the traditions and cultures of the various countries, which have always practiced this type of breeding. Italy, in Europe, is the country with the largest production of PDO (*Protected Designation of Origin*) cured meats and many fresh products that testify to its ancient link with this animal. African Swine fever (ASF) is a viral disease, which is currently one of the main health problems affecting livestock and the pig industry worldwide. In Europe it is characterized by a domestic cycle, involving pigs and a sylvan cycle, involving wild boars, while on the African continent it affects several species of wild pigs. This virus has numerous pitfalls and elements of particularity, due to its structure and its ability to evade the immune system, which make it unique in its kind, representing a new challenge for veterinarians and farmers. This work intends to offer a complete overview of what is the world epidemiological situation, with some attention to the African continent, but above all concerning the Italian national situation, starting from the most recent introduction of ASF, as well as an accurate description of the pathology in its different clinical presentations.

INTRODUZIONE

L'agente eziologico della PSA è il virus della peste suina africana (ASFV: *African swine fever virus*), un grande virus a DNA, a doppio filamento del genere *Asfivirus* all'interno della famiglia *Asfarviridae* (Alonso, et al., 2018). Le zecche molli del complesso *Ornithodoros* sono le uniche specie che fungono da vettori competenti per il virus della peste suina africana. L'ASFV si replica nella specie *Ornithodoros moubata* e può essere trasmessa tra maschi e femmine di questa specie per via transtadiale, transovarica. Le zecche possono essere infettate nutrendosi di suidi infetti e possono, a loro volta trasmettere il determinante di malattia ad altri ospiti tramite l'alimentazione. Le specie di zecche molli prendono contatto con l'ospite per nutrirsi per un periodo limitato (Dixon, et al., 2019).

La malattia in Africa sub-sahariana viene trasmessa quindi, in un antico ciclo selvatico tra facoceri e zecche molli appartenenti al genere *Ornithodoros* che fungono da vettore artropode competente. Questo ciclo non è accompagnato da malattie evidenti o mortalità nei facoceri e probabilmente passerebbe inosservato (Jori, et al., 2013). La particella di ASFV ha una morfologia icosaedrica con diametro medio di 200 nm ed è composta da diversi domini concentrici: un nucleo interno formato dal nucleoide centrale contenente il genoma rivestivo da uno spesso strato proteico designato come guscio del nucleo, un involucro lipidico interno che circonda il nucleo e il capside, che è lo strato più esterno dei virioni intracellulari. I virioni extracellulari possiedono un involucro esterno acquisito per gemmazione dalla membrana plasmatica.

L'analisi bidimensionale di virus extracellulari purificati ha identificato 54 proteine strutturali con pesi molecolari compresi tra 10.000 e 150.000 (Esteves, et al., 1986). In Europa, Asia e Africa, l'ASFV è facilmente trasmissibile tra suini domestici attraverso il contatto diretto e prodotti a base di carne suina contaminata e fomiti (Gaudreault, et al., 2020). La presentazione clinica e le lesioni patologiche macroscopiche della PSA ne suini domestici (*Sus scrofa*) possono variare a seconda della virulenza del ceppo, della via e della dose infettane e infine delle caratteristiche dell'ospite come, ad esempio, l'età e il *background* immunologico degli animali (Sanchez-Vizcaino, et al., 2015). Tutti i ceppi di ASFV mostrano un'elevata morbilità a causa dell'elevata efficienza della trasmissione virale, il periodo di incubazione varia da 2 a 5 giorni nelle infezioni oronasali sperimentali mentre si attesta tra 5 e 7 giorni nei casi di infezione naturale nelle forme cliniche acute o subacute. Gli isolati di ASFV possono essere classificati come altamente virulenti, moderatamente virulenti e a bassa virulenza (Pan, et al., 1984). I decorsi clinici osservati nella PSA nei suini domestici possono essere descritti come iperacuti, acuti, subacuti o cronici. L'obbiettivo della tesi è stato quello di fare un quadro epidemiologico mondiale, con particolare attenzione al contesto europeo e italiano, della diffusione della PSA, data la sua particolare importanza per il settore economico del nostro paese.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto con l'analisi e la raccolta dei dati epidemiologici, tramite bibliografia e report dell'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE: *Office International des Epizooties*), per poter inquadrare lo stato attuale della diffusione dell'infezione, nella popolazione di suini domestici e cinghiali allo stato brado.

Indagine epidemiologica. Dalla prima descrizione della malattia avvenuta nel 1921, diversi paesi sub-sahariani sono stati colpiti dalla PSA e la malattia è stata limitata a questa regione fino al 1957 anno in cui si è verificato, in Portogallo, il primo focolaio al di fuori del continente africano. Questa epidemia è stata efficacemente controllata e

debellata, ma in seguito un'ulteriore ondata epidemica si è verificata nel 1960 a Lisbona a causa di rifiuti dei voli aerei somministrati ai suini in allevamenti situati nei pressi dell'aeroporto (Ribeiro, et al., 1961). Recenti studi di genetica molecolare discriminano tra questi isolati, e suggeriscono la possibilità di due diverse introduzioni nell'area, da tali dati si deduce che la tracciabilità epidemica è interpretabile soltanto ricorrendo alla tipizzazione genetica. Da questi focolai iniziali, l'ASFV si diffuse in molte aree della penisola iberica (Spagna e Portogallo), dove rimase endemica fino al 1995. Durante gli anni 70 e 80 l'ASFV si è diffusa in tutto il mondo, interessando diversi paesi europei come i Paesi Bassi (1986), Italia (1967, 1980), Francia (1964,1967, 1977) e Belgio (1985). Inoltre, anche alcuni paesi delle Americhe sono stati interessati dalla malattia, in particolare a Repubblica Domenicana e il Brasile (Costard, et al., 2009).
L'ASFV è stata ulteriormente segnalata alla fine degli anni 70 in diversi paesi insulari dei Caraibi: Cuba (1978 e data dell'ultimo evento 1981) si ritiene che il virus sia stato introdotto dalla Spagna, Repubblica Domenicana (1978), Haiti (1979 e data dell'ultimo evento 1984).
All'inizio di aprile 2020, i seguenti paesi asiatici avevano segnalato focolai di ASFV: Cina, Hong Kong, Corea del Nord, Corea del Sud, Laos, Vietnam, Myanmar, Cambogia, Indonesia, Filippine, Timor Est, Papua Nuova Guinea e India (Blome, et al., 2020).

Diffusione della PSA nella Repubblica Popolare Cinese e paesi limitrofi. Il primo focolaio di PSA in Asia è stato segnalato nell'agosto 2018 e si è verificato nella Cina nord-orientale (Shenyang City, provincia di Liaoning). Poiché l'Asia, in particolare la Cina, rappresenta circa il 50% della popolazione suina globale, questa malattia ha già avuto un impatto sostanziale sull'agricoltura in tutto il mondo, senza alcuna prospettiva imminente di eradicazione e controllo della stessa (Pitts, et al., 2019).
La diffusione della PSA in tutta l'Asia è stata in gran parte unidirezionale. La similarità delle epidemie in diversi paesi, nonostante date di inizio molto diverse, suggerisce che le epidemie hanno avuto origine da un'unica fonte che poi si è propagata in tutta l'Asia. La caratterizzazione molecolare del virus sia in Cina che in Vietnam ha rivelato ceppi altamente omologhi, anch'essi in gran parte identici a quelli caratterizzati da epidemie avvenute in Georgia nel 2007, Russia nel 2012 e Polonia nel 2015 (Ge, et al., 2018). Pertanto, è altamente probabile che lo stesso ceppo coinvolto nel riemergere della PSA in Europa sia stato responsabile dei nuovi focolai in tutta l'Asia.

Diffusione della PSA in America. Negli Stati Uniti e in Canada, la produzione di carne suina è aumentata nell'ultimo decennio (Hartog, 2004). Gli Stati Uniti rappresentano uno dei principali paesi ad importare ed esportare carne suina al mondo (FAS USDA, 2006). La principale minaccia per i suini in questi paesi è l'introduzione di prodotti a base di carne suina infettati da ASFV tramite alimenti di scarto provenienti da aerei e navi, che arrivano da paesi endemici. In America centrale e meridionale si sono registrati focolai di PSA nel 1970 e 1980. Nei Caraibi, la PSA ha portato a programmi di spopolamento dei suini che, in alcuni casi, hanno comportato l'abbattimento dell'unico bestiame di proprietà di famiglie rurali a basso reddito.

Epidemiologia della PSA in Europa
Nel momento in cui la peste suina africana è stata nuovamente introdotta nel continente europeo nel 2007 questa volta attraverso la Georgia, e successivamente in diversi paesi transcaucasici e nella Federazione Russa, questa malattia esotica è diventata una minaccia

tangibile per l'industria suina dell'Unione Europea e la popolazione di cinghiali selvatici (Sanchez-Vizcaino, et al., 2013).
Oggi, diversi paesi europei sono stati colpiti e il virus si è diffuso in Asia, dove ha causato numerosi problemi nell'autunno del 2018. I seguenti paesi sono attualmente interessati dalla PSA nell'UE: Belgio, Bulgaria, Estonia, Grecia, Italia, Ungheria, Lettonia, Lituania, Polonia, Romania, Serbia e Slovacchia. Inoltre, al di fuori dell'UE Ucraina, Moldavia e Russia (ciascuno di essi segnala tutt'ora focolai).
Penisola Iberica. Nel nord-est della Spagna, dove l'allevamento intensivo di suini è predominante, la malattia si è diffusa rapidamente con conseguenze devastanti per l'intero settore produttivo. Fino al 1981, solo circa il 6% dei focolai di PSA nei suini domestici era associato al contatto diretto con cinghiali selvatici infetti. Si è concluso che la malattia non sarebbe persistita nei cinghiali, una volta eliminata dai suini domestici. Ciò è stato confermato dopo l'eliminazione della PSA dalla Spagna e dal Portogallo. Nel dettaglio, un'indagine condotta nel periodo compreso tra il 2006 ed il 2010, ha suggerito come nessun cinghiale nelle aree colpite fosse positivo, indicando così che l'infezione non si fosse mantenuta nella popolazione di cinghiali selvatici nel lungo periodo (Mur, et al., 2012).

Stati Baltici, Polonia e Germania. Negli Stati baltici (Lituania, Lettonia, Estonia), Polonia e Germania la maggior parte dei casi di PSA, infatti, è stata rilevata nella popolazione di cinghiali. La prima introduzione del genotipo II dell'ASFV è avvenuta nel gennaio 2014, quando la Lituania ha segnalato un caso di PSA nei cinghiali vicino al confine con la Bielorussa. Poche settimane dopo, il primo caso di PSA è stato registrato in Polonia in cinghiali, anche in questo caso vicino al confine bielorusso (Olsevskis, et al., 2016).
In seguito, l'Estonia ha segnalato casi di cinghiali selvatici infetti nel settembre 2014, nel sud-est, vicino al confine lettone, e nel nord-est, vicino al confine con la Federazione Russa.
Di fatto, nel 2019 circa l'86% della superficie della Lituania era affetta da PSA (Pautienius, et al., 2018).
In Lettonia la prima zona colpita dalla PSA si trovava al confine sud-orientale con la Bielorussia, seguita da un'introduzione nei cinghiali selvatici nel nord della Lettonia, vicino al confine con l'Estonia, presumibilmente attraverso lo smaltimento illegale di frattaglie nella foresta. Nel frattempo, quasi l'intero territorio della Lettonia è interessato dalla PSA (Olsevskis, et al., 2020).
In Polonia, fino al 2016, i casi di PSA nei cinghiali selvatici erano limitati ad un'area di circa 10 km lungo il confine con la Bielorussia. È infatti, probabile che si siano verificate ripetute introduzioni dalla Bielorussia in Polonia. Dal 2014 al 2016, i casi hanno mostrato una distribuzione nord-sud lungo il confine, con un'espansione dell'area colpita nel corso dell'anno 2017. Nel 2017 e nel 2018 il numero di cinghiali selvatici infetti da PSA è aumentato notevolmente (Pejsak, et al., 2018).
Nel settembre 2020, oltre questo confine "epidemiologicamente importante", in Germania si è registrato il primo caso di PSA nei cinghiali selvatici. Sia la vicinanza dei casi al confine tedesco-polacco che il loro raggruppamento suggeriscono diverse incursioni indipendenti in Germania. Inoltre, unitamente ai dati relativi alle sequenze del genoma virale completo ottenuto per diversi ceppi di ASFV, questo quadro dimostra come esista un'epidemia transfrontaliera che va a colpire la Polonia occidentale e la Germania (Sauter-Louis, et al., 2021).

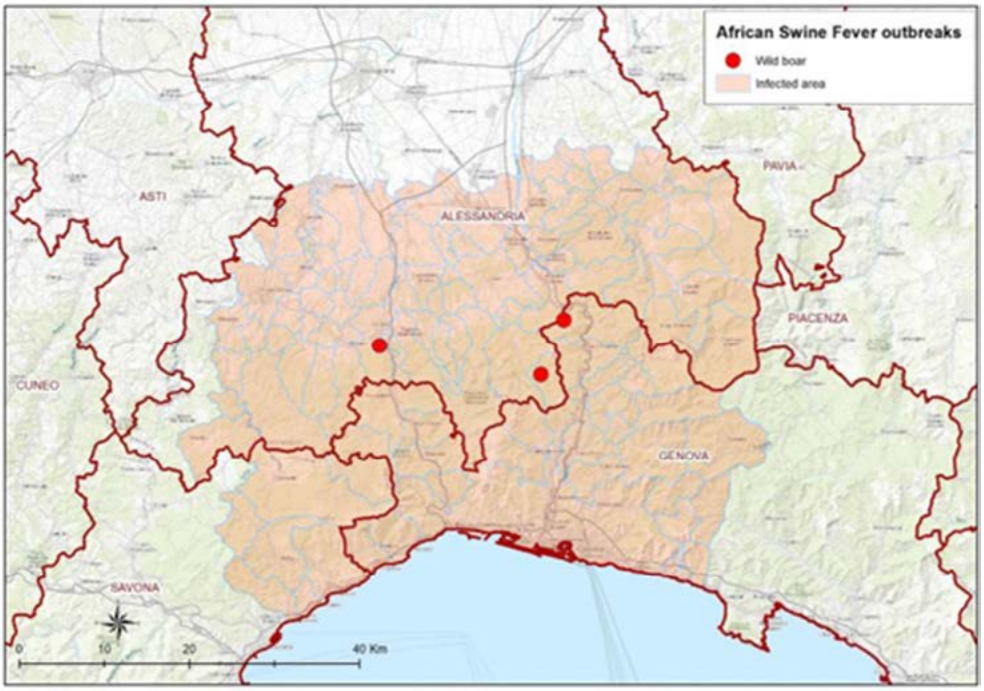
Repubblica Ceca e Belgio. Il primo caso di PSA nella Repubblica Ceca è stato notificato nel giugno del 2017 in due carcasse di cinghiale trovate vicino all'ospedale locale di Zlìn. Presumibilmente, il virus è stato introdotto attraverso l'attività umana (scarti alimentari) (OIE, 2019).
La genotipizzazione ha permesso di stabilire la somiglianza alle varianti che sono state trovate in altri paesi orientali e sub-orientali dell'UE (Moldova 2016, Ucraina 2012 e 2015, Bielorussia 2013). L'ASFV è rimasto limitato al distretto di Zlìn, e in questa zona il 71,7% delle carcasse di cinghiali selvatici campionate è risultato positivo all'ASFV da giugno 2017 ad aprile 2018. Inoltre, ad aprile del 2018 è stato trovata l'ultima carcassa di cinghiale positiva ad ASFV; in totale sono stati rilavati 230 casi di PSA, dei quali 212 in cinghiali trovati morti e 18 in animali cacciati (Satran, 2020).
Ciò sottolinea nuovamente l'importante ruolo della sorveglianza passiva nella diagnosi precoce della PSA. Un anno dopo l'individuazione dell'ultimo cinghiale positivo alla peste suina africana, la Repubblica Ceca ha presentato all'Organizzazione mondiale per la salute animale (ex OIE ed attuale *World Organisation for Animal Healt*h WOAH) un'autodichiarazione relativa all'eradicazione della PSA sul territorio.
Nonostante un 'elevata densità di cinghiali nella Repubblica Ceca, l'ASFV si è diffuso ad una velocità di circa 0,5 Km/mese, cioè più lentamente rispetto a quanto accaduto negli Stati baltici e in Polonia (Vaclavek, 2020).
Analogamente alla Repubblica Ceca, l'introduzione della PSA nei cinghiali selvatici in Belgio nel 2018 è stata presumibilmente causata dall'attività umana. I primi casi di PSA nei cinghiali selvatici sono stati rilevati nel settembre 2018.
Il virus è stato identificato come genotipo II ed è risultato essere strettamente correlato ai ceppi di ASFV provenienti da Ucraina, Bielorussia, Estonia e Russia europea (Forth, et al., 2019). Fino a marzo 2020, l'Agenzia federale belga per la sicurezza della catena alimentare aveva segnalato un totale di 833 casi di PSA nei cinghiali selvatici. In seguito, non sono più state rinvenute altre carcasse di cinghiali positivi all'ASFV. Di conseguenza il Belgio ha riacquisito il suo status di "libero da ASFV" da parte dell'OIE nel dicembre 2020 (AFSCA, 2020).

RISULTATI

In questa tesi ci si è concentrati in particolare sulla situazione italiana partendo dalla regione Sardegna. Dalla sua prima comparsa nel 1978, la PSA è rimasta endemica in Sardegna, con focolai che si verificano nei suini domestici e nei cinghiali (Torresi, et al., 2020). Nonostante i diversi programmi di eradicazione, sono stati rilevati focolai nei suini domestici fino al 2018, mentre l'ultimo campione positivo alla PCR (*Polymerase Chain Reaction*) nei cinghiali risale all'inizio del 2019 (Loi, et al., 2019). Tutti gli isolati sardi raccolti nel periodo compreso tra il 1978 e il 2018 appartengono al genotipo I, mentre, in altre aree d'Europa, Asia e Oceania, tutti gli isolati di ASFV circolanti appartengono al genotipo II, e tutti i genotipi p72 circolano in Africa (Dixon, et al., 2019).
L'Italia continentale, invece, è stato l'ultimo paese europeo a segnalare la diffusione della PSA, dove il primo cinghiale affetto da ASFV genotipo II è stato trovato nella regione Piemonte (Ovada, in provincia di Alessandria) nel gennaio 2022 a causa dell'attività di sorveglianza passiva locale. Successivamente diversi altri casi positivi sono stati segnalati nella popolazione di cinghiali in tutta la Liguria e il Piemonte, un'area montuosa tra il mare e le Prealpi, nonché il territorio urbano di Genova (Iscaro, et al., 2022).
Il 5 maggio 2022 la PSA è stata rilevata anche nella regione Lazio, in un giovane cinghiale presente nella zona nord della città di Roma e qualche settimana dopo, il 26 maggio, un ulteriore caso isolato è stato identificato nella provincia di Rieti in una carcassa di

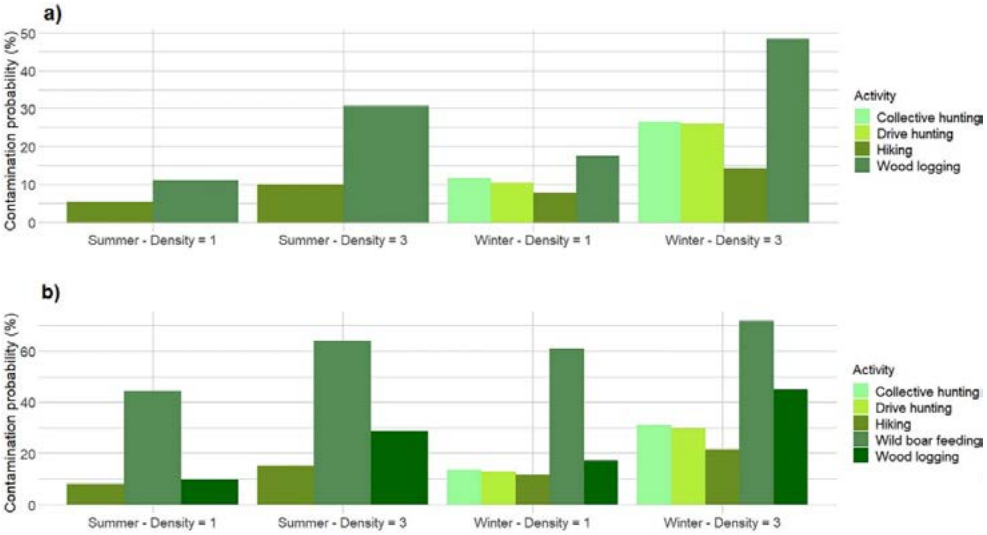
cinghiale incidentata. Successivamente il 9 giugno, la malattia è stata riscontrata anche in un allevamento suinicolo semibrado, a Roma, a poca distanza dalla zona di rinvenimento della prima carcassa di cinghiale infetta dell'area (Ministero della Salute, 2023).
Come previsto dalla normativa Europea (Regolamento UE 2016/429, Regolamento UE 2020/687), è stata istituita immediatamente una zona infetta tramite accordo ministeriale. Attualmente, comprende un'area corrispondente a 2811 km^2 che copre 114 comuni delle regioni Liguria e Piemonte (Figura 1), e in Lazio riguarda i comuni della provincia di Rieti e la zona di Roma; inoltre è stata identificata una zona limitrofa con un raggio di 10 km (Italian Ministry of Health, 2022).

Figura 1- Zona infetta da PSA Italia continentale, accordo ministeriale, 11 gennaio 2022.
Figure 1*- Infected area with PSA mainland Italy, ministerial agreement, January 11, 2022.*



Oltre ai cinghiali, è stato ampiamente confermato come anche gli altri utilizzatori del bosco (uomo compreso) possano essere coinvolti, involontariamente, nella diffusione virale (Figura 2), motivo per cui le linee guida nazionali vietano/ limitano la circolazione nei boschi in aree infette.

Figura 2- Probabilità di contaminazione ambientale della peste suina africana, corrispondente a una camminata simulata di 1 km in un percorso di 50 km2 di foresta in cui la PSA è endemica (prevalenza = 2%). Le probabilità di contaminazione sono espresse in percentuale e sono previste per cinque tipi di uso forestale, a diverse densità di cinghiali e in diverse stagioni, senza (a) e con (b) alimentazione artificiale del cinghiale.
Figure 2-*Probability of environmental contamination of African swine fever, corresponding to a simulated 1 km walk in a 50 km2 forest path where ASF in endemic (prevalence=2%). The probability of contamination is expressed as a percentage and is projected for five types of forest use, at different densities of wild boar and in different seasons, without (a) and with (b)artificial feeding of wild boar.*



DISCUSSIONE

Nell'Italia continentale è in corso quindi la diffusione inziale del virus in una popolazione di cinghiali suscettibili, con un elevato numero di casi non identificati. La sottostima dei casi potrebbe essere dovuta a diversi motivi, come le grandi dimensioni della zona infetta e le sue caratteristiche geografiche, ma anche quelle aree inaccessibili per le quali la visibilità delle carcasse può essere bassa a causa della presenza di fitte foreste, crepacci, burroni e neve (Iscaro, et al., 2022).

A circa un anno dal rilevamento del virus sul territorio continentale, la malattia rimane confinata alle regioni Piemonte, Liguria e Lazio; il fronte di malattia in Piemonte e Liguria è in lenta ma progressiva espansione sui versanti est ed ovest delle zone di infezione primaria e ciò determina la continua rimodulazione delle zone di restrizione (Ministero della Salute, 2023).

Mentre la situazione epidemiologica del Lazio sembra essere più favorevole, con l'assenza di nuovi casi sia nei selvatici sia nei domestici a partire da settembre del 2022. Questo trend positivo ha consentito di ridurre le zone di restrizione sia nella provincia di Rieti come pure in quella di Roma (Ministero della Salute, 2023).

I risultati degli studi iniziali di caratterizzazione molecolare hanno evidenziato un'elevata omologia di sequenza (99,80%- 99,90%) con altri ceppi rappresentativi di genotipo II caratterizzati nella regione del Caucaso, nella Federazione Russa, nel Sud-Est asiatico

e nell'Europa centro-orientale. Quindi tali dati indicano che l'introduzione dell'ASFV nell'Italia continentale è stata causata, molto probabilmente, da attività antropiche; sono invece scarse le possibilità di introduzione di ASFV genotipo I dalla Sardegna data l'assenza di casi a partire dal 2019 (Laddomada, et al., 2019).
Le condizioni riportate in Italia continentale rappresentano un nuovo scenario per il controllo della diffusione dell'ASFV nella popolazione di cinghiali, a causa del territorio montuoso interessato, e l'applicazione di nuove modalità operative può essere necessaria per il contesto italiano (Iscaro, et al., 2022).
Il presente elaborato riporta un'analisi il più completa possibile del contesto epidemiologico mondiale attuale del virus della Peste Suina Africana (ASFV), evidenziando la sua diffusione nel corso degli anni, con una prima introduzione in Europa e, successivamente una seconda propagazione dai paesi dell'Est Europa; contemporaneamente alla sua circolazione e diffusione in America, Cina e Sud-Est Asiatico e infine la sua costante presenza nel continente africano. Sono state inoltre evidenziate le differenze e le similitudini nelle manifestazioni cliniche, nella diffusione e nella mortalità tra suino domestico e cinghiale, a seconda del genotipo circolante. Chiaramente, questo agente virale dimostra un forte impatto economico nel settore suinicolo, in ragione della mortalità degli animali (tasso di mortalità), a causa della malattia e al conseguente abbattimento dei restanti capi dell'allevamento; soprattutto nei paesi come l'Italia, dove vengono lavorati molti prodotti tipici rinomati a base di carne suina, oppure la Cina, che esporta notevoli quantità di carne e ha una elevatissima concertazione di questa specie sul territorio nazionale.
Assume notevole importanza anche la circolazione di ASFV all'interno del ciclo silvestre, che vede coinvolti i cinghiali in Europa e diversi suidi selvatici in Africa, rappresentando il principale serbatoio virale.
ASFV presenta una struttura e un meccanismo di evasione immunitaria attualmente non del tutto noti, fatto questo che rende estremamente complicato lo sviluppo di una idonea ed efficace terapia vaccinale. La poca applicabilità della vaccinazione nei selvatici e la difficoltà della loro stessa gestione, è dovuto anche all'habitat e all'impossibilità di effettuare un vero censimento della popolazione, a differenza della vaccinazione nei suini domestici, che presenta meno problematiche pratiche. Tuttavia, la strategia di contenimento della diffusione virale dovrà sempre essere coadiuvata da un'elevata biosicurezza e disinfezione degli ambienti e delle attrezzature; anche se, al momento, non sono noti vaccini efficaci nel contrastare ASFV.

CONCLUSIONE

I risultati del presente studio evidenziano nuovamente la necessità che, la gestione dell'emergenza sanitaria, causata dalla PSA, deve essere affrontata con approccio globale ed integrato, applicando efficienti misure di prevenzione, per evitare l'introduzione del virus sul territorio e il suo conseguente mantenimento nel ciclo silvestre. Ogni strategia sanitaria deve essere svolta in sinergia con le adeguate misure di eradicazione negli allevamenti colpiti, in attesa di una profilassi vaccinale efficace o altra terapia, al fine di tutelare: in primis il benessere animale e infine anche il settore economico delle produzioni animali, di cui il comparto suinicolo è senza alcun dubbio uno dei maggiori esponenti in un'ottica One Health.

BIBLIOGRAFIA

1. AFSCA African Swine Fever. [Journal]. - 2020. - http://www.afsca.be/asp/aktualitat/belgien/.
2. Alonso C. [et al.] ICTV virus taxonomy profile: asfarviridae [Journal]. - [s.l.] : J. Gen. Virol, 2018. - Vol. 99.

3. Anon Eradication program of African swine fever in Spain Madrid [Journal]. - [s.l.] : pain: Ministero de Agricultura-Pesce y Alimentacion, Direccion General de la Produccion Agraria, Subdireccion General de Sanidad Animal , 1990.
4. Blome S., K. Franzke e M. Beer African swine fever – A review of current knowledge [Libro]. - Germany : Virus Research, 2020.
5. Carrascosa J.L. [et al.] General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1984. - 132.
6. Costard S [et al.] African swine fever: how can global spread be prevented? [Journal]. - [s.l.] : Phil. Trans., 2009. - 364, 2683– 2696.
7. Dellicour S [et al.] Unravelling the dispersal dynamics and ecological drivers of the African swine fever outbreak in Belgium [Journal]. - [s.l.] : J. Appl. Ecol., 2020.
8. Dixon L K, H. Sole e H. Roberts African Swine Fever. [Journal]. - [s.l.] : Antiviral Res, 2019. - 165, 34–41.
9. Dixon Linda K. [et al.] African Swine Fever Epidemiology and Control [Journal]. - [s.l.] : Annual Review of Animal Biosciences, 2019. - Vol. Vol. 8:221-246 .
10. Esteves A., M.I. Marques e J.V. Costa Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1986. - Vol. 152.
11. European Union EU Regulation on animal by-products not intended for human consumption. [Journal]. - 2002. - (http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R1774:20070724:EN:PDF).
12. FAS USDA (Foreign Agricultural Service–United States Department of Agriculture) Livestock and poultry: world market and trade. [Journal]. - 2006.
13. Forth J H [et al.] Comparative Analysis of Whole-Genome Sequence of African Swine Fever Virus Belgium 2018/1 [Journal]. - [s.l.] : Emerg. Infect. Dis, 2019. - 25, 1249–1252..
14. Gaudreault N Natasha [et al.] African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus [Journal]. - [s.l.] : Sec. Veterinary Infectious Diseases, 2020. - Vol. 7.
15. Ge S [et al.] Molecular characterization of African Swine Fever virus, China, 2018 [Journal]. - [s.l.] : Emerging Infectious Diseases, 2018. - 24(11), 2131. https://doi.org/10.3201/eid2411.181274.
16. Hartog den L Developments in global pig production. [Journal]. - [s.l.] : Adv. Pork Prod, 2004. - 15, 17–24.
17. Iscaro C [et al.] January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy [Journal]. - [s.l.] : Transboundary and Emerging Diseases, 2022. - p. 1707-1711 : Vol. 69.
18. Italian Ministry of Health Decreto dirigenziale recante ‘Istituzione di una zona infetta a seguito di conferma di casi di peste suina africana nei selvatici [Journal]. - 2022. - https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2022&codLeg=85035&parte=1%20&serie=null.
19. Jori F [et al.] Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean [Sezione di libro]. - [s.l.] : Virus research, 2013.
20. L Mur M., Atzeni [et al.] hirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2016. - 63, e165–e177.
21. Laddomada A [et al.] Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: A serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : Vet. Rec, 1994. - 134, 183–187.
22. Laddomada A [et al.] urveillance and control of African Swine Fever in free-ranging

pigs in Sardinia. [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis, 2019. - 66, 1114–1119.
23. Loi F [et al.] Standardized risk analysis approach aimed to evaluate the last standardized risk analysis approach aimed to evaluate the last African swine fever eradication program performance in Sardinia. [Journal]. - [s.l.] : Front. Vet. Sci, 2019. - 6, 299.
24. Lyra TM The eradication of African swine fever in Brazil, 1978–1984 [Journal]. - [s.l.] : Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot, 2006. - 25, 93–103.
25. Ministero della Salute Dati epidemiologici nazionali e internazionali [Journal]. - 2023. - https://www.salute.gov.it/portale/pesteSuinaAfricana/dettaglioContenutiPSA.jsp?lingua=italiano&id=5955&area=pesteSuinaAfricana&menu=vuoto.
26. Mur L [et al.] 35-year presence of african swine fever in sardinia: history, evolution and risk factors for disease maintenance. [Journal]. - [s.l.] : Transbound Emerg Dis. , 2014. - 3:113. doi: 10.1111/tbed.12264.
27. Mur L [et al.] Monitoring of African swine fever in the wild boar population of the most recent endemic area of Spain [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2012. - 59, 526–531.
28. OIE Self-Declaration of the Recovery of Freedom from African Swine Fever in All Suids by the Czech Republic; [Atti di convegno] // Self-declaration submitted to the OIE on 1 April 2019 by Dr. Zbynek Semerád, Director General State Veterinary Administration,. - Paris, France : Ministry of Agriculture, Czech Republic, OIE Delegate for Czech Republic, 2019.
29. OIE WAHID Office International des Epizooties–World Animal Health Information Database (WAHID) Interface [Journal]. - 2009. - http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home.
30. Olsevskis E [et al.] African swine fever in Latvian wild boar—A step closer to elimination [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2020. - 67, 2615–2629.
31. Olsevskis E [et al.] African swine fever virus introduction into the EU in 2014: [Journal]. - [s.l.] : xperience of Latvia. Res. Vet. Sci., 2016. - 105, 28–30.
32. Pan IC e W.R. Hess Virulence in African swine fever: its measurement and implications. [Journal]. - [s.l.] : Am J Vet Res, 1984. - 45:361–6.
33. Pautienius A [et al.] Prevalence and spatiotemporal distribution of African swine fever in Lithuania, 2014–2017 [Journal]. - [s.l.] : Virol. J, 2018. - 15, 177.
34. Pejsak Z. [et al.] Four years of African swine fever in Poland. New insights into epidemiology and prognosis of future disease spread. [Journal]. - [s.l.] : Pol. J. Vet. Sci, 2018. - 21, 835–841.
35. Pitts N e T. Whitnall Impact of African Swine Fever on global markets. [Journal]. - [s.l.] : Agricultural Commodities, 2019. - http://www.agriculture.gov.au/abares/research-topics/agricultural-commodities/sep-2019/african-swine-fever.
36. Regolamento 17 dicembre 2019 n. 686 REGOLAMENTO DELEGATO (UE) 2020/686 DELLA COMMISSIONE [Rapporto]. - [s.l.] : GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA, 2020.
37. Ribeiro J J Manso e J.A. Azevedo La peste porcine africaine au Portugal [Journal]. - [s.l.] : Bull. Off. Int. Epizoot, 1961. - 55, 88– 108.
38. Sanchez-Vizcaino JM [et al.] An update on the epidemiology and pathology of African swine fever [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol, 2015. - 152:9–21. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.09.003.
39. Sanchez-Vizcaino JM, L. Mur e B. Martinez-Lopez African swine fever (ASF): five years around Europe [Journal]. - [s.l.] : Vet. Microbiol, 2013. - pp. 45-50.
40. Satran P From ASF Infection in Wild Boar to Eradication and Free Status Recovery in the Czech Republic. [Journal]. - 2020. - http://web.oie.int/RR-Europe/eng/Regprog/

docs/docs/SGE%20ASF12/17_CZ_detailed_situation.pdf.
41. Sauter-Louis C [et al.] African swine fever: Why the situation in Germany is not comparable to that in the Czech Republic or Belgium [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2021.
42. Seifert HSH Tropical animal health (eds Technical Centre for Agriculture and Rural Cooperation) [Journal]. - [s.l.] : Ede, The Netherlands: Springer, 1996.
43. Smietanka K [et al.] African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. [Journal]. - [s.l.] : Emerg. Infect. Dis., 2016. - 22, 1201–1207.
44. Torresi C [et al.] The evolution of African swine fever virus in Sardinia (1978–2014) as revealed by whole-genome sequencing and comparative analysis [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2020.
45. Vaclavek P ASF in the Czech Republic: Management Experience and Lessons Learnt. [Journal]. - 2020. - http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/reu/europe/documents/events2019/ASF_reg/06.pdf.
46. Wooldridge M [et al.] Quantitative risk assessment case study: smuggled meats as disease vectors [Journal]. - [s.l.] : Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot, 2006. - 25, 105–117.

PATTERN DI DISTRIBUZIONE CELLULARE IN LINFADENOPATIE DEL SUINO

PATTERN OF CELL DISRIBUTION IN SWINE LIMPHADENOPATHIES

D'ANNUNZIO G.[1], MUSCATELLO L.V.[2], LUPPI A.[1], FIORENTINO M.[3]; FRANCESCHINI T.[3], GRILLINI A.[3], RUGNA G.[1]; SARLI G.[2]; MANDRIOLI L.[2]

[1]Isituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e della Emilia-Romagna
[2]Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna
[3] Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche dell'Università di Bologna

Parole chiave: CD3, CD20, IBA-1, metodica immunoistochimica tripla, istopatologia, PCV2; PRRSV
Keywords: CD3, CD20, IBA-1, triple staining protocol, histopathology, PCV2, PRRSV

Riassunto
Lo scopo del presente lavoro è stato quello di condurre una indagine preliminare sulla valutazione della risposta tissutale di linfonodi di suino, nello specifico in casi di iperplasia linfoide reattiva aspecifica, PCV2-Systemic Disease (SD) e PRRSV. Il quadro istologico osservato mediante colorazione con ematossilina eosina è stato affiancato dalla fenotipizzazione immunoistochimica delle popolazioni linfocitarie (CD3, CD20) e macrofagica (IBA-1), mediante l'applicazione di una metodica immunoistochimica tripla. Ciò con la finalità di potere osservare contestualmente, sulla stessa sezione, variazioni di distribuzione spaziale delle 3 tipologie cellulari indagate.
I risultati dell'esame istopatologico dei casi di iperplasia linfoide aspecifica hanno evidenziato la presenza di follicoli secondari con centri germinativi prominenti e riduzione percentuale del tessuto medulla-like. I casi caratterizzati da moderata a grave deplezione linfoide erano inseriti nel quadro di una forma sistemica di malattia da PCV2 (PCV2-SD). L'esame microscopico delle sezioni di linfonodo dei casi positivi al PRRSV ha evidenziato una grave iperplasia della porzione linfonodale paracorticale, espansa da cellule blastiche.
Con la metodica immunoistochimica tripla, i casi di iperplasia reattiva erano caratterizzati da porzione paracorticale del linfonodo espansa dalla proliferazione di cellule CD3+ e follicoli linfoidi espansi da cellule CD20+; contestualmente nel tessuto medulla-like erano presenti un numero esiguo di cellule IBA1+. Nei casi di PCV2-SD, le cellule linfocitarie presenti a livello di linfonodi erano prevalentemente, singole positive, CD20+ ed IBA1+, con marcata riduzione e deplezione delle cellule CD3+. La linfoadenopatia da PRRSV è risultata invece caratterizzata da un'espansione di cellule CD20+, non solo presenti a livello di follicoli linfoidi ma a caratterizzare anche la popolazione linfocitaria iperplastica della porzione paracorticale.
Alla classica indagine istopatologica e immunoistochimica mediante impiego di singolo anticorpo, una metodica come quella impiegata è risultata in grado di visualizzare in modo simultaneo la reattività delle popolazioni cellulari presenti in un tessuto plastico come quello linfonodale. L'uso di questa metodica, validata in campo medico per lo studio del microambiente tumorale, trova quindi valida ed interessante applicazione anche in campo anatomopatologico veterinario, associato, come nell'indagine in esame, allo studio delle modificazioni linfonodali in importanti malattie infettive del suino.

Abstract
The aim of this preliminary investigation was to evaluate the tissue response of pig lymph nodes affected by aspecific reactive lymphoid hyperplasia, PCV2-Systemic Disease (SD) and PRRSV.
The histopathological examination associated with triple immunohistochemistry for the immunophenotyping of the lymphocyte (CD3, CD20) and macrophage (IBA-1) populations allowed to simultaneously observe, on the same section, variations in the spatial distribution of the 3 cell types investigated.
Histopathological examination revealed: the presence of secondary follicles with prominent germinal centers and percentage reduction of medullary tissue in lymph nodes with nonspecific lymphoid hyperplasia; moderate to severe lymphoid depletion in cases of PCV2-systemic disease (PCV2-SD); severe hyperplasia of the paracortical lymph node portion, expanded by blast cells, in lymph nodes of PRRSV-positive cases.
The results of triple immunohistochemistry showed paracortical proliferation of CD3+ cells, expansion of CD20+ cells within follicles of hyperplastic lymph nodes and small number of IBA1+ cells within the medulla-like area. In cases of PCV2-SD, the lymph nodes were characterized predominantly by CD20 and IBA1-single positive cells, with a marked reduction and depletion of CD3+ cells. PRRSV lymphadenopathy was characterized by expansion of CD20+ cells, both within lymphoid follicles and in the paracortical portion of lymph nodes. The histopathological investigation associated with a method capable of detecting multiple antigens within the same tissue has made it possible to simultaneously visualize the reactivity of the cell populations present in a plastic tissue such as the lymph node. The use of triple immunohistochemistry, validated in human medicine for the study of the tumor microenvironment, therefore also finds valid and interesting application in veterinary pathology to study infectious disease-associated changes in porcine lymph nodes.

INTRODUZIONE

I linfonodi di suino rappresentano un campione tissutale di elevato valore diagnostico ed interpretativo in patologia suina, sia per il ruolo svolto in quanto organi linfoidi secondari sede di sviluppo della risposta immunitaria adattativa, che in quanto organi *target* di lesioni macro e microscopiche di agenti infettivi determinanti immunosoppressione, quali PCV2 e PRRSV. Infatti entrambi questi agenti virali infettano i macrofagi e danneggiano a vari livelli le difese dell'ospite aumentando la sua suscettibilità all'infezione da parte di patogeni secondari opportunisti, costituendo quindi un serio problema sanitario nell'allevamento suinicolo.
La malattia sistemica da PCV2 (PCV2-SD) è caratterizzata da un grave deterioramento del sistema immunitario, come espresso dalle lesioni microscopiche caratterizzate primariamente da deplezione linfoide e da cambiamenti delle sottopopolazioni linfocitarie presenti nei tessuti linfoidi (Darwich e Mateu 2012). In questi tessuti ed in particolare nei linfonodi, si osserva grave deplezione dei linfociti B e T e aumento del numero di macrofagi e perdita o ridistribuzione delle cellule dendritiche interfollicolari (Chianini et al. 2003). Nei tessuti linfoidi, la deplezione dei linfociti T riguarda principalmente le cellule CD4+ e, in misura minore, le cellule CD8+ (Sarli et al. 2001).
In corso di forme post-natali di PRRSV le lesioni includono: polmonite interstiziale diffusa, linfoadenopatia generalizzata e infiltrati linfocitari in diversi tessuti (Caswell e Williams, 2016). L'esame di tessuti linfoidi quali linfonodi, tonsille, milza di suini affetti da PRRSV rivela apoptosi e necrosi dei linfociti centrofollicolari nei centri germinativi dei follicoli, soprattutto in corso di fasi iniziali di infezione, seguiti nelle fasi più tardive da

iperplasia follicolare e iperplasia paracorticale nei linfonodi (Brockmeier et al. 2017; He et al. 2012; Wang et al. 2011, Valli et al., 2016). Deplezione linfoide seguita successivamente da iperplasia può essere osservata anche nelle guaine linfoidi periarteriolari della milza e nei follicoli linfoidi delle tonsille e delle placche del Peyer (Halbur et al. 1995; Pol et al. 1991).
Mentre per la linfoadenopatia indotta da PCV2 l'immunofenotipizzazione delle popolazioni linfocitarie a livello di tessuti linfoidi ha permesso di individuare come principale modifica la riduzione di linfociti B e T e aumento del numero di macrofagi, in corso di iperplasia linfoide da PRRSV sono soprattutto le cellule B (Lemke et al, 2004) ad essere aumentate a livello di centri germinativi, in associazione a necrosi linfoide, e con caratterizzazione immunoistochimica si è evidenziato anche un lieve aumento numerico dei linfociti T CD3 positivi (Jung e Kim, 2013).
Alla luce della disponibilità di protocolli per la rilevazione immunoistochimica simultanea di antigeni multipli in una stessa sezione di tessuto, scopo del presente lavoro è stato quello di esaminare la variazione delle popolazioni linfocitarie in sezioni di linfonodo in corso di linfoadenopatia da PCV2-SD e da PRRS nel confronto con la condizione di classica iperplasia linfoide, utilizzando contestualmente e simultaneamente marker anticorpali per la rilevazione di linfociti di tipo T, linfociti B e macrofagi.

MATERIALI E METODI

Nello studio sono stati esaminati mediante istopatologia seguita da reazione immunoistochimica tripla linfonodi di suino di cui: tre affetti da iperplasia linfoide reattiva aspecifica (a, b, c), negativi all'indagine con PCR e con indagine immunoistochimica sia per PCV2 che per PRRSV, tre linfonodi di suini affetti da PCV2-SD (d, e, f) positivi in PCR e ad indagine immunoistochimica per PCV2, tre linfonodi di suini affetti da PRRS (g, h, i) positivi in PCR e con indagine immunoistochimica per PRRSV. I tessuti sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in blocchetti di paraffina da cui sono state ricavate sezioni di 3 micron di spessore per l'esecuzione della colorazione ematossilina eosina per la valutazione delle lesioni microscopiche, ed in parallelo sezioni per lo studio e fenotipizzazione immunoistochimica delle popolazioni linfocitarie presenti nei diversi casi in esame.
La metodica immunoistochimica tripla si è basata sull'impiego contemporaneo di anticorpi anti- CD20, CD3, e IBA1.Per tutte le analisi immunoistochimiche sono state utilizzate sezioni di 4 µm. L'intera procedura di colorazione è stata eseguita in un immunocoloratore automatizzato (Discovery Ultra Roche Diagnostics). La sparaffinatura è stata svolta con EZ Prep solution e lo smascheramento antigenico con CC1 solution a 95° per 40 minuti. Per identificare i linfociti T, Linfociti B e macrofagi è stato utilizzato un protocollo di tripla colorazione. In breve, abbiamo utilizzato come anticorpi primari CD3 (clone 2GV6), CD20 (policlonale) utilizzato con diluizione 1:300 e un anticorpo policlonale contro Iba1 alla diluizione 1:2500. Dopo l'incubazione dell'anticorpo primario CD3, i vetrini sono stati trattati con un multimero di coniglio (Rb-HRP) come anticorpo secondario e successivamente con DAB (diaminobenzidina) per il rilevamento della reazione. Per la rilevazione di CD20, in sequenza, è stato dispensato l'anticorpo, amplificato tramite un kit di amplificazione (Amp A e B), dispensato il multimero di coniglio (Rb-HRP) e successivamente i vetrini sono stati trattati con il colorante Discovery Teal HRP. Per la rilevazione di IBA1 si è proceduto con la dispensazione e incubazione dell'anticorpo, il multimero di topo (Ms-HRP) è servito come anticorpo secondario, seguito dal kit di colorazione Discovery Purple HRP. I vetrini sono stati puliti tramite lavaggio con Reaction Buffer.

RISULTATI

L'esame istopatologico dei casi a, b, c, (30907,30909, 30906) ha evidenziato un grado da moderato a grave di iperplasia linfoide (Guarneri et al., 2021), caratterizzato da presenza di follicoli secondari con centri germinativi prominenti del tessuto esaminato (Figura 1 A, B) e riduzione percentuale del tessuto medulla-like (Figura 1C). I casi d, e, f, (26106,126104,26107) erano caratterizzati da moderata a grave deplezione linfoide (Opriessnig et al., 2011), nel quadro di una forma sistemica di malattia da PCV2, diagnosticata mediante esame istologico e conferma di positività IHC all'antigene virale di PCV2 (Figura 2B), secondo gli attuali criteri per la diagnosi delle malattie da PCV2 (Segales e Sibila, 2022). L'esame microscopico delle sezioni di linfonodo dei casi g, h ed i (75077, 81142, 74273) positivi al PRRSV ha evidenziato una grave iperplasia della porzione linfonodale paracorticale, espansa da cellule blastiche (Figura 3).

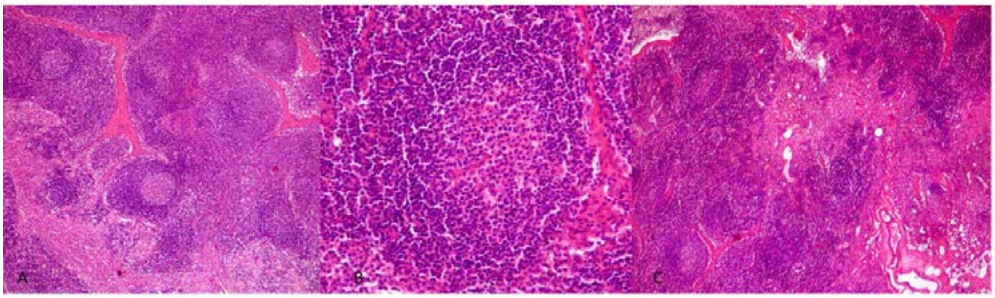


Figura 1. *Linfonodo, iperplasia reattiva. Ematossilina eosina. Caso 30907. A) tessuto linfoide espanso da Follicoli secondari reattivi (4x); B) follicolo con centro germinativi prominente (20x); C) riduzione del tessuto medulla-like (4x).*
Figure 1*. Lymph node, reactive hyperplasia. Haematoxylin-eosin. Case 30907. A) Secondary follicles expanding lymphoid tissue (4x); B) reactive follicles with germinal center (20x); C) medulla-like tissue reduction (4x).*

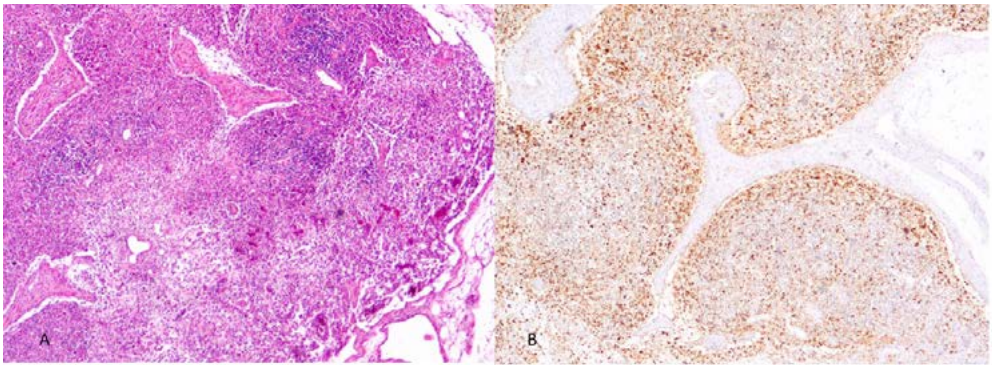


Figura 2. *Linfonodo, PCV2-SD. Caso 26106. A) Moderata deplezione linfoide, ematossilina eosina (4x); B) conferma immunoistochimica della positività all'antigene virale PCV2 (4x).*
Figure 2*. Lymph node, PCV2-SD. Caso 26106 A). Moderate lymphoid depletion, hematoxylin eosin (4x); B) immunohistochemical labeling of PCV2 viral antigen (4x).*

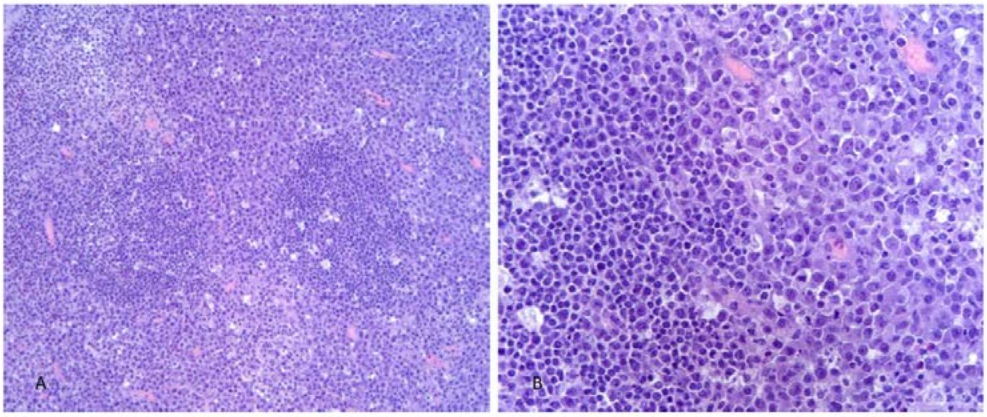


Figura 3. *Linfonodo, linfadenopatia da PRRSV. Caso 74273. Ematossilina eosina. A) Due follicoli linfoidi non reattivi al centro circondati da una popolazione di elementi blastici che espandono la paracorticale (4x). B) A maggior ingrandimento le cellule blastiche, presenti nella parte destra dell'immagine, mostrano limiti cellulari distinti, sono caratterizzate da ampio citoplasma, nucleo singolo e nucleolo non ben evidente(20x).*
Figure 3. *Lymph node, PRRSV lymphadenopathy.Case 74273. Hematoxylin eosin. A)Two primary lymphoid follicles at the center surrounded by a population of blasts that expand the paracortical area (4x). B) At higher magnification the blastic cells, present on the right side of the image, show distinct cell boundarie and are characterized by large cytoplasm, single nucleus and indistinct nucleolus (20x).*

L'indagine immunoistochimica condotta con metodica tripla ha permesso di evidenziare come colorati in marrone dalla diamminobenzidina (DAB) la reazione CD3+ (linfociti T), colorati in azzurro invece dal colorante Discovery Teal HRP i linfociti CD20+ (fenotipo B) mentre in fucsia dal Discovery Purple HRP gli istiociti/macrofagi rispettivamente del tessuto medulla-like e centrofollicolari (Figura. 4).

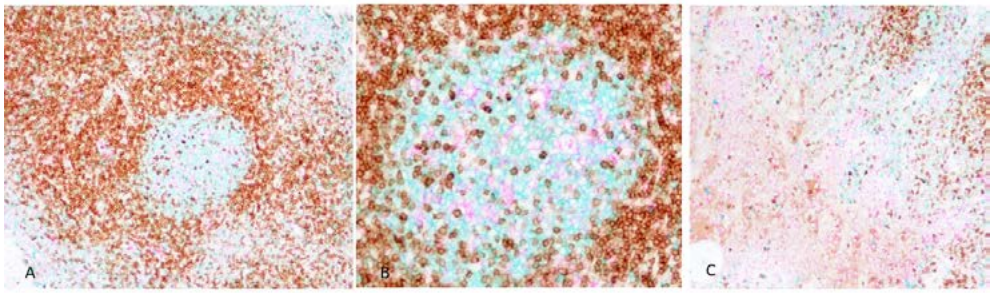


Figura 4. *Linfonodo, Metodica immunoistochimica tripla. A) Linfociti T colorati in marrone (DAB) mediante anticorpo anti-CD3 (10x); B) Linfociti B colorati in azzurro con anticorpo anti-CD20 e macrofagi centrofollicolari colorati in fucsia con anticorpo anti-IBA1 (40x); C) macrofagi del tessuto medulla-like colorati in rosa con anticorpo anti-IBA1 (10x).*
Figure 4. *Lymph node, Triple immunohistochemical method. A) Brown- T lymphocytes (DAB) labeled by CD3 antibody (10x); B) Blue- B lymphocytes labeled with anti-CD20 antibody and pink- macrophages within the center of follicles labeled with IBA1 antibody (40x); C) macrophages labeled in purple with IBA1 antibody within the medulla (10x).*

Con la metodica immunoistochimica tripla, i casi di iperplasia reattiva erano caratterizzati da porzione paracorticale del linfonodo espansa dalla proliferazione di cellule CD3+ e follicoli linfoidi espansi da cellule CD20+; contestualmente nel tessuto medulla-like erano presenti un numero esiguo di cellule IBA1+ (Figura 5). Nei casi di PCV2-SD, le cellule linfocitarie presenti a livello di linfonodi erano prevalentemente, singole positive, CD20+ ed Iba1+, con marcata riduzione e deplezione delle cellule CD3+ (Figura 6). La linfoadenopatia da PRRSV nei tre casi esaminati è risultata invece caratterizzata da un'espansione di cellule CD20+ non solo presenti a livello di follicoli linfoidi ma a caratterizzare anche la popolazione linfocitaria iperplastica della porzione paracorticale (Figura 7).

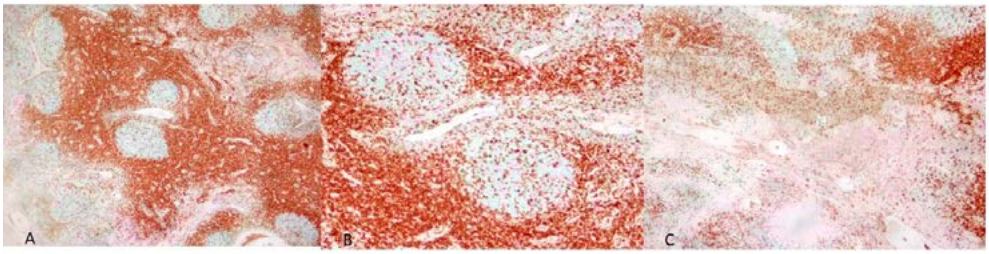


Figura 5. *Linfonodo, Iperplasia reattiva. Metodica tripla immunoistochimica. A) Porzione paracorticale del linfonodo espansa dalla proliferazione di cellule CD3+* (marroni) *(4x); B) follicoli linfoidi espansi da cellule CD20+* (azzurro) *(10x) C) nel tessuto medulla-like sono presenti in numero esiguo cellule macrofagiche IBA1+*(fucsia) *(4x).*
Figure 5. *Lymph node, Reactive hyperplasia. Triple immunohistochemical method. A) Paracortical portion of the lymph node expanded by CD3+-cells* (brown) *(4x); B) Lymphoid follicles expanded by CD20+-cells (blue) (10x); C) macrophages labeled with IBA1 antibody (purple) within the medulla (4x*).

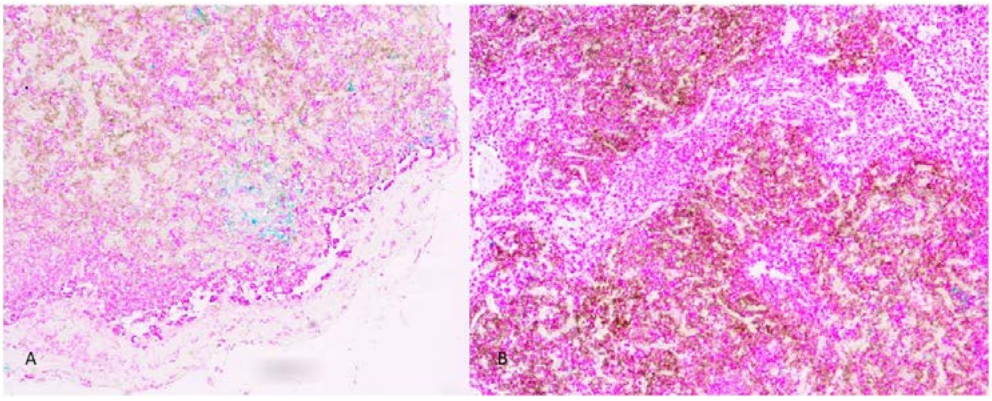


Figura 6. *Linfonodo, PCV2-SD. Metodica tripla immunoistochimica. A) L*e cellule linfocitarie presenti a livello di linfonodi sono prevalentemente, , CD20+ (azzurro) ed IBA1+ (fucsia), con marcata riduzione e deplezione delle cellule CD3+ (marroni) (4x). B) Porzione medulla-like espansa da macrofagi IBA1-positivi (fucsia) (4x).
Figure 6. *Lymph node, PCV2-SD. Triple immunohistochemical method. A) Prevalence of CD20-single positive (blue) and IBA1- positive (purple) cells with marked reduction and depletion of CD3+ (brown) cells (4x). B) IBA1-positive macrophages (purple) within the medulla (4x).*

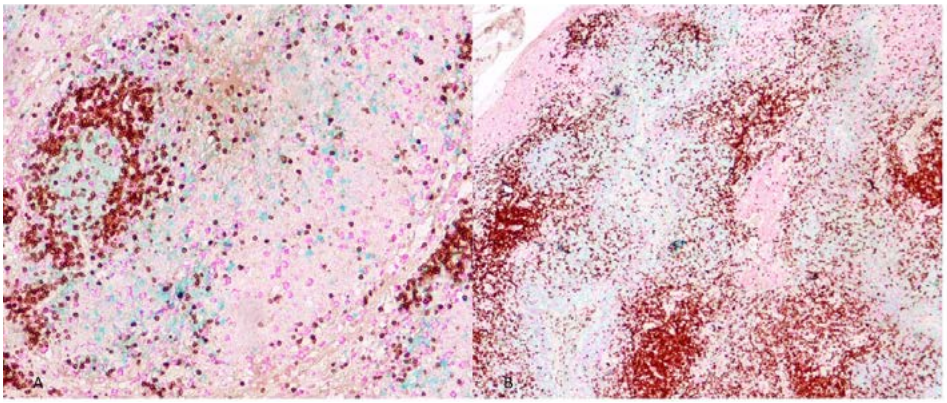


Figura 7. *Linfonodo, linfoadenopatia da PRRSV. Metodica tripla immunoistochimica. Si nota un'espansione di cellule CD20+ (azzurre) non solo presenti a livello di follicoli linfoidi (10x) (A), ma a caratterizzare anche la popolazione linfocitaria iperplastica della porzione paracorticale (4x) (B).*
Figure 7. *Lymph node, PRRSV lymphadenopathy*. Triple immunohistochemical method. A) CD20+ cells (blue) within lymphoid follicles (10x); B) paracortical portion of lymph node expanded by CD20-labeled cells (4x).

DISCUSSIONE

L'impiego dell'istopatologia per la diagnosi delle malattie infettive del suino permette non solo di evidenziare pattern di lesioni indicative di infezione da parte di specifici agenti patogeni, ma anche, tramite tecniche ad elevata specificità quali l'immunoistochimica (IHC) o l'ibridazione in situ (ISH), di stabilire la causalità di malattia associando la presenza di un determinato antigene o acido nucleico ad una lesione caratteristica (Hofman et al., 2017; Gupta et al., 2009; Haines e West, 2005). Se per alcune patologie infettive del suino l'istopatologia e la co-localizzazione dell'agente infettivo con le rispettive lesioni si configura come *gold standard* diagnostico (Segalés e Sibila, 2022; Segalés, 2012), indubbio è il valore di queste metodiche *in situ* per lo studio del ruolo dei patogeni in corso delle principali malattie del suino (Grau-Roma e Segalés, 2007; Hansen et al., 2010b, 2010a; Trang et al., 2014), nei modelli di co-infezione (Ober et al., 2017; Opriessnig et al., 2004; Park et al., 2014; Ramamoorthy et al., 2011) e negli studi di patogenesi (Haines e West, 2005).
L'interazione ospite-patogeno è un processo dinamico che vede il coinvolgimento della risposta immunitaria innata prima, e di tipo adattativo poi, per la risoluzione delle infezioni. Nei centri germinativi di tessuti linfoidi secondari come i linfonodi, dopo la presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche (*antigen presenting cells)* avviene la differenziazione antigene-dipendente di linfociti T e B antigene-specifici e i processi di *isotype switching* and *affinity maturation* degli anticorpi affinchè si sviluppi una risposta immunitaria mirata e robusta capace di risolvere l'infezione (Kumar et al., 2021). Pertanto l'impiego di singoli *markers* immunoistochimici volti a caratterizzare la risposta linfonodale ha trovato un impiego anche a fini di ricerca, per ampliare le conoscenze relative alla patogenesi e modulazione della risposta immunitaria. Vi è evidenza infatti che per patogeni immunosoppressori come il PCV2, nei casi naturali di infezione vi è un cambiamento (assoluto o relativo) nelle proporzioni dei diversi sottoinsiemi di linfociti. Cambiamento che sembra essere correlato ai livelli di PCV2 nei tessuti linfoidi e all'entità della deplezione nelle aree dipendenti dalle cellule B e T di questi tessuti (Darwich et al., 2002).

Le lesioni istopatologiche nei tessuti linfoidi in corso di PCV-SD sono state caratterizzate tramite metodi immunoistochimici (Shibahara et al., 2000, Sarli et al., 2001, Chianini et al., 2003), e consistono principalmente in riduzione delle cellule B e deplezione delle aree T dipendenti, aumento dei macrofagi subcapsulari e peritrabecolari e perdita parziale e ridistribuzione delle cellule presentanti l'antigene nei tessuti linfoidi (Chianini et al., 2003). La gravità delle variazioni relative alle sottopopolazioni linfocitarie risulta inoltre fortemente correlata alla gravità delle lesioni istologiche e alla quantità di antigene o acido nucleico di PCV2 nelle lesioni (Segalés et al., 2004). La popolazione linfocitaria maggiormente coinvolta nella deplezione è nota comprendere cellule T di tipo CD4+ T helper, ed in misura minore cellule T citotossiche CD8+ (Sarli et al., 2001).
Nel nostro studio l'impiego di una metodica immunoistochimica tripla con utilizzo di *marker* volti alla rilevazione contemporanea su stessa sezione di tessuto di cellule CD3+ (linfociti T), CD20+ (linfociti B) e IBA1+ (macrofagi) ha permesso di studiare la distribuzione spaziale delle sottopopolazioni linfocitarie evidenziando una moderata/grave riduzione dei linfociti T nei linfonodi caratterizzati da deplezione linfoide e positivi al PCV2+. Questo dato è in linea quindi con quanto noto in letteratura, con l'interessante novità derivata dalla possibilità di osservare simultaneamente la diversa espressione dei *marker* nei tessuti dei casi in esame. Nell'interpretazione dei risultati la metodica si è mostrata peculiare nel confronto dei casi di linfadenopatia da infezione virale rispetto alla iperplasia linfoide reattiva aspecifica. Infatti il risultato della reazione immunoistochimica tripla sui casi di iperplasia ha evidenziato, come atteso, linfociti B CD20+ a popolare i follicoli linfoidi e linfociti T CD3+ nella porzione paracorticale del linfonodo. Nei casi PRRSV+, microscopicamente, i linfonodi presentavano una linfoadenopatia caratterizzata da iperplasia follicolare con multifocale necrosi dei centri follicolari ed espansione e iperplasia della porzione paracorticale, quest'ultima popolata da cellule blastiche immature. Con la caratterizzazione fenotipica tali cellule sono risultate essere cellule B CD20+. Questo dato rappresenta una novità rispetto a quanto noto sull'iperplasia linfoide che accompagna l'infezione da PRRSV, in cui tipicamente la popolazione linfocitaria iperplastica nella porzione paracorticale è costituita da linfociti T (Kick et al., 2019). È noto che l'infezione da PRRSV induce immunosoppressione interferendo soprattutto con lo sviluppo di una risposta immunitaria innata efficace (Cai et al., 2023; Rodríguez-Gómez et al., 2013) con impatto conseguente anche sulla maturazione delle cellule B: infatti con l'infezione da PRRSV la funzione timica è compromessa e la trasmissione del segnale tra le cellule T *helper* follicolari e le cellule B diminuisce, ritardando la comparsa di anticorpi neutralizzanti specifici e ad alta affinità per PRRSV (Cai et al., 2023). Le cellule blastiche di tipo B presenti a livello di porzione paracorticale del linfonodo potrebbero rappresentare un'indicazione di ritardo nella maturazione e nello sviluppo di una immunità efficace. Trattandosi di risultati preliminari, ci si propone tuttavia di estendere le indagini su di una casistica più ampia per lo studio fenotipico delle dinamiche di reattività ed iperplasia linfocitaria nei tessuti linfoidi di casi PRRSV+.

CONCLUSIONI

La classica metodica immunoistochimica trova da anni applicazione nelle malattie infettive come metodo di rilevazione e discernimento tra agenti eziologici e incidentali, permettendo la quantificazione e la localizzazione spaziale degli antigeni nelle lesioni (Sarli et al., 2021). Allo stesso modo consente la fenotipizzazione delle cellule che compongono i tessuti mediante l'utilizzo di *marker* specifici per diverse componenti cellulari, che vanno da *cluster* di differenziazione per la caratterizzazione dei linfociti, *marker* per filamenti citoscheletrici per la differenziazione tra cellule di diversa origine embrionale, a *marker* per recettori, enzimi e proteine strutturali di vie di segnalazione intracellulare per lo studio dei *pathway* di funzionalità cellulare. Tuttavia uno dei limiti della IHC è quello di poter colorare un solo

antigene per singola sezione di tessuto. Il rilevamento di più antigeni tissutali su di una stessa sezione può essere ottenuto eseguendo l'immunoistochimica (IHC) per gli antigeni *target* individualmente in sezioni seriali o applicando contestualmente più IHC in una singola sezione di tessuto, come nel caso della reazione immunoistochimica tripla impiegata in questo studio preliminare sulle popolazioni linfocitarie in linfonodi di suino. Questa tipologia di metodiche immunoistochimiche multiple consentono di fornire risultati più informativi mediante il rilevamento simultaneo di più marcatori su una singola sezione di tessuto, garantendo da una parte che le informazioni topografiche del tessuto siano mantenute e permettendo dall'altra lo studio completo della composizione cellulare, della funzionalità cellulare e delle interazioni cellula-cellula (Tan et al., 2020; Osman et al., 2013), rivelandosi utile supporto allo studio e comprensione delle dinamiche di malattia anche nelle malattie infettive del suino.

BIBLIOGRAFIA

1. Brockmeier, S.L, Loving, C.L., Palmer, M.V., Spear, A., Nicholson, T.L., Faaberg, K.S., Lager, K.M. (2017). Comparison of Asian porcine high fever disease isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to United States isolates for their ability to cause disease and secondary bacterial infection in swine. Vet Microbiol. 203,6-17
2. Cai, H., Zhang, H., Cheng, H., Liu, M., Wen, S., & Ren, J. (2023). Progress in PRRSV Infection and Adaptive Immune Response Mechanisms. Viruses, 15(7), 1442.
3. Caswell, J.F, Williams, K.J. (2016). Chapter 5 Respiratory system. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol 2. 6th edition, Elsevier, Saint Louis, Missouri, pp 465-591.
4. Chianini, F., Majó, N., Segalés, J., Domínguez, J., Domingo, M. (2003). Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Immunol Immunopathol. 15, 63-75.
5. Darwich L, Segalés J, Domingo M, Mateu E. (2002). Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. Clin Diagn Lab Immunol. Mar;9(2):236-42.
6. Darwich, L, Mateu, E. (2012) Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 164, 61-77.
7. 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. Veterinary Microbiology 119, 144–151.
8. Guarneri, F., Tresoldi, E. T., Sarli, G., Boniotti, M. B., Lelli, D., Barbieri, I., Bacci, B., D'Annunzio, G., & Amadori, M. (2021). Dataset of immune responses induced in swine by an inactivated Porcine Circovirus 2b vaccine. Data in brief, 35, 106906.
9. Gupta, E., Bhalla, P., Khurana, N., Singh, T., (2009). Histopathology for the diagnosis of infectious diseases. Indian journal of medical microbiology 27, 100–6.
10. Haines, D.M., West, K.H., (2005). Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. Veterinary immunology and immunopathology 108, 151–156.
11. Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A. (1995). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the lelystad virus. Vet. Pathol. 33, 159–170.

12. Hansen, M.S., Pors, S.E., Bille-Hansen, V., Kjerulff, S.K.J., Nielsen, O.L., (2010a). Occurrence and tissue distribution of porcine circovirus type 2 identified by immunohistochemistry in danish finishing pigs at slaughter. Journal of Comparative Pathology 142, 109–121.
13. Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M., Nielsen, O.L. (2010b). An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. Journal of Comparative Pathology 143, 120–131.
14. He, Y., Wang, G., Liu, Y., Shi, W., Han, Z., Wu, J., Jiang, C., Wang, S., Hu, S., Wen, H., Dong, J., Liu, H., Cai, X. (2012). Characterization of thymus atrophy in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Microbiol. 160, 455–462.
15. Hofman, P., Lucas, S., Jouvion, G., Tauziède-Espariat, A., Chrétien, F., Cathomas, G. (2017). Pathology of infectious diseases: what does the future hold? Virchows Archiv : an international journal of pathology 470, 483–492.
16. Jung, J-Y and Kim, J-H. (2013). Pathologic studies in lymph nodes of pigs infected with porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Korean J. Vet. Res. 53, 245-251.
17. Kick, A. R., Amaral, A. F., Cortes, L. M., Fogle, J. E., Crisci, E., Almond, G. W., & Käser, T. (2019). The T-Cell Response to Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). Viruses, 11(9), 796.
18. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster J. C. (2021). Diseases of the Immune System. In: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 10th ed. Chapter 6, 189-266
19. Lemke, C.D., Haynes, J.S., Spaete, R., Adolphson, D., Vorwald, A., Lager, K., Butler, J.E. (2004). Lymphoid hyperplasia resulting in immune dysregulation is caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs. J Immunol. 172,1916-1925.
20. Ober, R.A., Thissen, J.B., Jaing, C.J., Cino-Ozuna, A.G., Rowland, R.R.R., Niederwerder, M.C. (2017). Increased microbiome diversity at the time of infection is associated with improved growth rates of pigs after co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). Veterinary Microbiology 208, 203–211.
21. Opriessnig, T., Madson, D. M., Roof, M., Layton, S. M., Ramamoorthy, S., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2011) "Experimental Reproduction of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Enteritis in Pigs Infected with PCV2 Alone or Concurrently with Lawsonia intracellularis or Salmonella typhimurium" J Comp Pathol 145, 261–270.
22. Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G. (2004). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with Mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2. Veterinary Pathology 41, 624–640.
23. Osman TA, Øijordsbakken G, Costea DE, Johannessen AC. (2013). Successful triple immunoenzymatic method employing primary antibodies from same species and same immunoglobulin subclass. Eur J Histochem.;57(3):e22.
24. 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. Journal of General Virology 95, 2486–2494.
25. Pol, J.M., van-Dijk, J.E., Wensvoort, G., Terpstra, C. (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally in- duced

infections of mystery swine disease (synonm: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). Vet. Q. 13,137-143.

26. Ramamoorthy, S., Opriessnig, T., Pal, N., Huang, F.F., Meng, X.J. (2011). Effect of an interferon-stimulated response element (ISRE) mutant of porcine circovirus type 2 (PCV2) on PCV2-induced pathological lesions in a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) co-infection model. Veterinary Microbiology 147, 49–58.
27. Rodríguez-Gómez, I. M., Gómez-Laguna, J., & Carrasco, L. (2013). Impact of PRRSV on activation and viability of antigen presenting cells. World journal of virology, 2(4), 146–151.
28. 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.
29. Sarli, G., Mandrioli, L., Laurenti, M., Sidoli, L., Cerati, C., Rolla, G., & Marcato, P. S. (2001). Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Veterinary immunology and immunopathology, 83(1-2), 53–67.
30. Segalés, J., & Sibila, M. (2022). Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. Vet. Sci. 9, 110.
31. Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus research 164, 10–9.
32. Segalés, J., Domingo, M., Chianini, F., Majó, N., Domínguez, J., Darwich, L., & Mateu, E. (2004). Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. Veterinary microbiology, 98(2), 151–158.
33. Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y., & Kadota, K. (2000). Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. The Journal of veterinary medical science, 62(11), 1125–1131.
34. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, Lim JCT, Yeong J, Lim TKH. (2020) Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. Cancer Commun (Lond). 40(4):135-153. doi: 10.1002/cac2.12023.
35. 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. Journal of Veterinary Science 15, 361–367.
36. Valli, V.E.O. (Ted), Kiupel, m., Bienzie, D. (with Wood, R.D): Chapter 2 Hematopoietic syste.m. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol 2. 6th edition, Elsevier, Saint Louis, Missouri, pp 102-268.
37. Wang, G., Song, T., Yu, Y., Liu, Y., Shi, W., Wang, S., Rong, F., Dong, J., Liu, H., Cai, X., Zhou, E.M. (2011). Immune responses in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 142, 170–178.

PREMIO
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2024

VINCITORE

UNA CATTIVA DISINFEZIONE DEGLI AMBIENTI NELL'ALLEVAMENTO SUINO PUO' PREDISPORRE ALLA PERSISTENZA DELL' ANTIMICROBICO-RESISTENZA?

CAN POOR DISINFECTION PRACTICES IN PIG FARMING PREDISPOSE THE ENVIRONMENTAL MAINTEINANCE OF ANTIMICROBIAL-RESISTENCE?

VINCENTI V.[1], MARRA C.[2], NOVARA R.[1], CARUSO C.[3], ZOPPI S.[2], SCOLLO A[1].

[1]Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Veterinarie;
[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta S.S. Patologia Animale;
[3]Azienda Sanitaria Locale Cuneo 1

Parole chiave: antimicrobico-resistenza, suino, disinfezione
Keywords: antimicrobial-resistance, swine, disinfection

Riassunto
Gli allevamenti suini sono colonizzati da batteri antimicrobico-resistenti che rappresentano una minaccia per la salute animale ed umana. Le procedure di pulizia e disinfezione sono un aspetto fondamentale per il controllo e la diffusione delle malattie in allevamento. Lo scopo del lavoro è indagare se pratiche scorrette di sanificazione dell'allevamento possano predisporre alla persistenza di batteri antimicrobico-resistenti quali: *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA), *Enterobacteriaceae* produttrici di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), di tipo AmpC e di carbapenemasi ed *Enterococcus* vancomicina-resistenti. È stata anche indagata la correlazione tra la prevalenza di questi batteri ed ambienti con scarsa igiene, identificati tramite la valutazione della carica mesofila totale, *Staphylococcus* spp. ed *Enterococcus* spp. Lo studio è stato condotto in 20 allevamenti suini da ingrasso piemontesi attraverso analisi e confronto di tamponi ambientali eseguiti prima e dopo la sanificazione degli ambienti. Soltanto i batteri carbapenemi-resistenti hanno riportato un azzeramento della carica post-lavaggio. I batteri ESBL sono passati da 45% a 20%, i vancomicina-resistenti da 49,4% a 26,3% e gli MRSA da 55% a 45%. Non sembra esserci correlazione tra cariche batteriche elevate, indicatrici di scarso livello igienico, e prevalenza di batteri antimicrobico-resistenti. L'elevata prevalenza nell'allevamento suino di batteri antimicrobico-resistenti è un risultato preoccupante, soprattutto perché le procedure di pulizia e disinfezione messe in atto sembrano poco efficaci nel contrastare la diffusione dell'antimicrobico-resistenza. Emerge la necessità di individuare protocolli di disinfezione più mirati.

Abstract
Pig farms are colonized by antimicrobial-resistant bacteria that represent a threat for both animal and human health. Cleaning and disinfection procedures are essential for diseases'control and spread on farms. The aim of this work is to evaluate whether incorrect farm sanitation practices can predispose the persistence of antimicrobial-resistant bacteria such as: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), of the AmpC type and carbapenemases and vancomycin-resistant *Enterococcus*. Correlation between the prevalence of antimicrobial-resistent bacteria and dirty environments was also investigated, as identified through the evaluation of total mesophilic load, *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. The study was conducted in 20 Piedmont fattening

pig farms through the analysis and comparison of environmental swabs carried out before and after cleaning and disinfection procedures. Carbapenem-resistant bacteria have reported a zeroing of the post-washing charge. ESBL bacteria went from 45% to 20% post cleaning and disinfection procedures, vancomycin-resistant bacteria from 49.4% to 26.3% and MRSA from 55% to 45%. The findings also suggested no correlation between high bacterial loads, indicators of poor hygiene levels, and high prevalence of antimicrobial-resistant bacteria. High prevalence of these bacteria in pig barns after cleaning and disinfection procedures is challenging. In particular cleaning and disinfection procedures seemed to be ineffective in countering the spread of antimicrobial resistance. The findings suggest that tailored and more targeted cleaning and disinfection procedures protocols might be needed in order to improve their efficacy and to counteract the antimicrobial-resistance spread.

INTRODUZIONE

Da quando la Peste Suina Africana (PSA) è diventata la malattia epizootica più rilevante in ambito di sanità animale, l'adozione di corrette procedure di biosicurezza sta acquisendo sempre maggior importanza all'interno degli allevamenti suini. All'interno di queste procedure riveste particolare importanza l'applicazione di corrette prassi igieniche ed in particolare quelle relative alla pulizia e alla disinfezione degli allevamenti. Pulizia e disinfezione sono fondamentali per l'inattivazione dei patogeni, per prevenire la diffusione di malattie e facilitare il ripopolamento dopo un focolaio.

Una pulizia effettuata correttamente consente di rimuovere fino al 90% dei microrganismi e di migliorare l'efficacia della disinfezione. Infatti, molti disinfettanti hanno minor effetto in presenza di materia organica (De Lorenzi, 2020). La disinfezione, invece, consiste nella riduzione, inattivazione o distruzione dei microrganismi. L'efficacia di questo processo è influenzata da numerosi fattori quali: scelta del prodotto, superficie di contatto, temperatura, pH, durezza dell'acqua etc. Proprio dalla molteplicità dei fattori da considerare nasce la difficoltà di individuare e mettere in pratica dei protocolli corretti di disinfezione.

La verifica dell'efficacia delle procedure di pulizia e disinfezione in ambito di sicurezza igienico sanitaria degli alimenti è comunemente effettuata con metodi microbiologici. Negli anni sono stati descritti diversi indicatori microbiologici che forniscono una stima della capacità del programma di sanificazione aziendale. Tra i più diffusi si ritrovano: la carica batterica mesofila totale, gli *E. coli*, le Enterobacteriaceae ed i coliformi (Agüeria, 2021) (Luyckx, 2015), oltre a *Staphylococcus* spp. (Threlfall, 2000) (Deiters, 2015). La carica batterica mesofila totale indica il numero di unità formanti colonie (CFU) che crescono su una piastra durante uno specifico periodo di incubazione a temperature mesofile (30-37 °C circa). È una stima del numero di microrganismi che si formano a quelle determinate condizioni. Le Enterobacteriaceae fanno invece parte della normale flora microbica intestinale dell'uomo e degli animali, hanno una distribuzione ubiquitaria e sono anche ampiamente diffuse nell'ambiente (e.g. terreno, acqua) (Rochelle-Newall, 2015). Essi sono microrganismi indicatori di contaminazione fecale poiché popolano l'intestino degli animali omeotermi e vengono escreti nel materiale fecale (Brisola, 2019). Sono inoltre molto resistenti nell'ambiente (Halkman, 2014). Allo stesso modo, anche alcuni batteri del genere *Staphylococcus* fanno parte della normale flora microbica di uomo e animali. Tra le principali specie patogene per gli animali e l'uomo vi è *S. aureus*, caratterizzato da elevata persistenza ambientale e resistenza ai trattamenti terapeutici, favorita anche dalla sua capacità di formare il biofilm (Derek E Moormeier, 2017). Molti stafilococchi sono resistenti agli antimicrobici e vengono definiti MRSA (*S. aureus* meticillino-resistenti). Questi batteri sono stati scelti come microrganismi sentinella perché molto diffusi negli ambienti di allevamento e tra le persone a contatto con gli animali o che vivono in regioni ad alta vocazione suinicola (Threlfall, 2000) (Deiters, 2015). In ultimo, il genere *Enterococcus* comprende cocchi Gram-

positivi anaerobi facoltativi, alcuni dei quali sono mobili per la presenza di piccoli flagelli. Sono batteri ubiquitari in quanto si trovano facilmente su piante, insetti, animali selvatici e sono comuni abitanti dell'intestino di animali e uomo. La presenza degli Enterococchi negli allevamenti suini è stata dimostrata tramite l'isolamento dalla cute e dalle feci degli animali di questa specie oltre che da mangime, lettiera e attrezzature presenti in allevamento. Per i motivi sopracitati, questi batteri possono essere considerati buoni indicatori di contaminazione fecale delle superfici (Gradel, 2004). La loro capacità di sopravvivenza in ambienti ostili è anche attribuibile alla capacità di formare biofilm che determina una minor efficacia dei disinfettanti sulle superfici colonizzate (Zaheer, s.d.) (Zaheer, 2020).
Come evidenziato da diversi studi, è noto che gli allevamenti suini sono colonizzati da batteri resistenti agli antibiotici; in particolare, MRSA ed enterobatteri produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL-E). Dal 52 al 73% e dal 44 all'85% dei suini allevati in Germania sono risultati positivi a MRSA ed ESBL-E, rispettivamente. Tali batteri non colonizzano solo i suini, ma si possono trasmettere a coloro che lavorano negli allevamenti. È stato dimostrato che dal 24% all'86% degli allevatori tedeschi di suini alberga MRSA a livello nasale, e dal 4% al 6% alberga ESBL-E a livello rettale (Karsten Becker, 2014) (Julia Fischer, 2017). Tali batteri non si ritrovano solo sugli animali, ma anche su superfici e attrezzature a contatto con essi (Schmithausen, 2015).
L'obiettivo del lavoro è stato quello di comprendere se pratiche scorrette di pulizia e disinfezione dell'allevamento suino possano predisporre alla selezione di batteri antimicrobico-resistenti. Nello specifico, sono stati ricercati staphylococchi meticillino-resistenti, enterobatteri produttori di β-lattamasi di tipo AmpC e di carbapenemasi ed enterococchi vancomicina-resistenti. Questi microrganismi sono considerati batteri sentinella per il monitoraggio dell'antimicrobico-resistenza (Schmithausen, 2015). La valutazione è stata condotta attraverso l'analisi ed il confronto di tamponi ambientali eseguiti prima e dopo le procedure sanificazione degli ambienti di allevamento.
È stata poi valutata la correlazione tra batteri resistenti agli antimicrobici e carica batterica totale, valutata sugli stessi tamponi ambientali. Questa valutazione è stata condotta per capire se abbassando la carica batterica totale, tramite l'applicazione di buone pratiche di pulizia, si può indirettamente contrastare lo sviluppo di batteri antimicrobico-resistenti negli ambienti di allevamento.

MATERIALI E METODI

Per questo progetto di tesi sono stati selezionati 20 allevamenti di suini da ingrasso localizzati in diverse province piemontesi: Torino, Cuneo e Vercelli. Le aziende incluse nello studio sono state scelte casualmente sulla base della localizzazione geografica e del momento produttivo, ovvero a fine ciclo, con suini di circa 9 mesi di età ed un peso vivo di 165-170 kg. La lista delle aziende è stata fornita dall'ASL CN1 distretto di Racconigi e da veterinari liberi professionisti operanti sul territorio. Gli allevatori sono stati contattati telefonicamente e hanno aderito al progetto su base volontaria.
Presso ogni azienda sono stati eseguiti dei campioni ambientali nel periodo compreso tra marzo e luglio 2023. Ogni azienda è stata campionata in due momenti: dopo lo svuotamento dei locali di stabulazione (con ambienti ancora sporchi) e alla fine delle procedure di pulizia e disinfezione, prima dell'ingresso dei nuovi capi nell'allevamento.

Protocollo di campionamento

Sono stati effettuati dei tamponi ambientali all'interno di box selezionati in maniera casuale all'interno dell'allevamento, nei quali sono stati scelti quattro diversi siti di prelievo identificati mediante numero progressivo: punto di abbeverata (1), punto di alimentazione (2), area di defecazione (3), materiali manipolabili (4)(Figura 1).
Il protocollo è stato eseguito prima e dopo la sanificazione, per un totale di otto campioni per azienda.
Le superfici piane (area di defecazione, materiale manipolabile e mangiatoia per alimento

secco) sono state campionate attraverso l'utilizzo di garze sterili. Gli abbeveratoi a succhiotto e i tubi di alimentazione liquida sono stati campionati mediante l'utilizzo di tamponi. Entrambi i dispositivi di prelievo sono stati precedentemente imbevuti in acqua peptonata tamponata sterile (Buffered Peptone Water, BPW).
Il campionamento tramite garza sterile è stato effettuato eseguendo movimenti in orizzontale e in verticale in modo da coprire un'area di 25 cm^2 per ogni sito. Il campionamento tramite tampone è stato effettuato con movimenti rotatori sulla superficie interna ed esterna dei tubi di alimentazione e abbeverata. Tutti i campioni ambientali sono stati raccolti secondo le procedure ISO 18593.2018.

Figura 1: foto sul campo dei siti di prelievo pre e post pulizia e disinfezione: punto di abbeverata (1), punto di alimentazione (2), area di defecazione (3), materiali manipolabili (4).
Figure 1: pictures of sampling sites in farms during the trial: nipple drinkers (1), trough or feeding tube (2), corner in the dunging area (3), manipulable material (4).

Conservazione e trasporto campioni
Le garze ed i tamponi sono stati stoccati all'interno di provette coniche (Falcon®) contenenti BPW nel volume di 5 ml e 1 ml rispettivamente. Le provette sono state identificate con i numeri rappresentativi dei siti di prelievo (1: punto di abbeverata; 2: punto di alimentazione; 3: area di defecazione; 4: materiali manipolabili).
I campioni sono stati conservati refrigerati e processati entro 24 ore. Il laboratorio presso cui sono state effettuate le analisi è l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Diagnostica Generale, S.S. Patologia Animale.

Analisi microbiologiche
Operazioni preliminari
Sono stati addizionati 9 ml di Buffered Peptone Water (BPW) al campione prelevato con tampone e 45 ml di BPW al campione prelevato con garza, ottenendo così la diluizione 10^{-1}.
Diluizioni e semina campioni PRE lavaggio
È stato prelevato 1 ml dalla diluizione 10^{-1} e sono state effettuate diluizioni da 10^{-2} a 10^{-5} in BPW. La semina è stata effettuata per spatolamento prelevando 100 µl dalle opportune diluizioni.
Per la ricerca di *E.coli* sono state seminate le diluizioni 10^{-4} e 10^{-5} su agar MacConkey (MCK, Microbiol) mentre per la ricerca della carica batterica mesofila totale su piastre di Plate Count Agar (PCA, Microbiol). Le piastre sono state incubate rispettivamente a 37°C per 24h ed a 30°C per 48h. Per la ricerca di batteri del genere *Enterococcus* spp, sono state seminate le

diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} su agar Slanetz-Bartley (SBA, Microbiol) e incubate a 42°C per 48h. Le stesse diluizioni sono state seminate sul terreno Baird Parker Agar Base + RPF (RPF, Microbiol) per la ricerca dei batteri del genere *Staphylococcus* spp. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24h.

Diluizioni e semina campioni POST lavaggio

È stato prelevato 1 ml dalla diluizione 10^{-1} e sono state effettuate diluizioni da 10^{-2} a 10^{-4}. La semina è stata effettuata per spatolamento prelevando 100 µl dalle opportune diluizioni. Le diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} sono state seminate su agar MCK e PCA, mentre le diluizioni 10^{-2} e 10^{-3} su SBA e RPF. Tempi e temperature di incubazione sono stati i medesimi dei campioni PRE lavaggio.

Prima identificazione delle colonie

In caso di crescita di colonie è stata effettuata la conta, selezionata una colonia per tipo trapiantandola su Columbia Blood Agar (AS) ed inviata all'identificazione mediante MALDI-TOF (Bruker GmbH).

Successivamente sono state prelevate alcune ansate della coltura batterica pura fresca e stemperate all'interno della provetta per la crioconservazione dei ceppi. Dopo aver lasciato riposare la provetta per dieci minuti, mediante una pipetta Pasteur, è stato rimosso il crioconservante. Le provette sono state conservate a -80°C.

Terreni cromogeni

Le quattro diluizioni 10^{-1} sono state collocate a -80°C per 24h. Dopo aver creato un pool con 200 µl di ciascun campione, è stata effettuata la semina diretta sui terreni cromogeni: Chromatic ESBL +AmpC per la ricerca di ESBL ed AmpC in *Enterobacteriaceae* (Liofilchem), Chromatic VRE per la ricerca di enterococchi resistenti alla vancomicina (Liofilchem), Chromatic CRE per la rilevazione di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (Liofilchem), Chromatic OXA-48 per la ricerca di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi OXA-48 (Liofilchem) ed infine l'Oxacillin Resistance Screening Agar Base ORSAB, per la rilevazione di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (Oxoid).

Seconda identificazione delle colonie

Tutti i terreni sono stati incubati a 37°C in aerofilia dalle 18h alle 48h, secondo le indicazioni dei produttori di terreni di coltura. Si è effettuata quindi la conta delle colonie e la selezione di n°1 colonia per tipo trapiantandola su AS. Le colonie sono state inviate all'identificazione mediante MALDI-TOF (Bruker GmbH).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta mediante software XLSTAT 2022.2.1(Addinson, TX, USA, 2022). Le differenze tra le cariche batteriche riscontrate nel pre- e nel post-lavaggio e le relative resistenze agli antimicrobici sono state analizzate mediante il test di Kruskal-Wallis per comparazioni multiple, utilizzando il metodo di Dunn e la correzione di Bonferroni. La prevalenza di campioni positivi per VRE (vancomicina-resistenza), OXA-CRE (carbapenemasi), ESBL AMP C (beta-lattamasi a spettro esteso) e ORSAB (meticillino-resistenza) è stata calcolata con un intervallo di confidenza del 95% (95% CI).

RISULTATI

La prevalenza di batteri produttori di carbapenemasi (OXA) è stata del 5% pre-lavaggio, mentre si è azzerata dopo le operazioni di pulizia. Le positività riscontrate prima del lavaggio sono risultate significativamente più frequenti (P = 0,013) in presenza di cariche maggiori di *Staphylococcus spp.* (Figura 2).

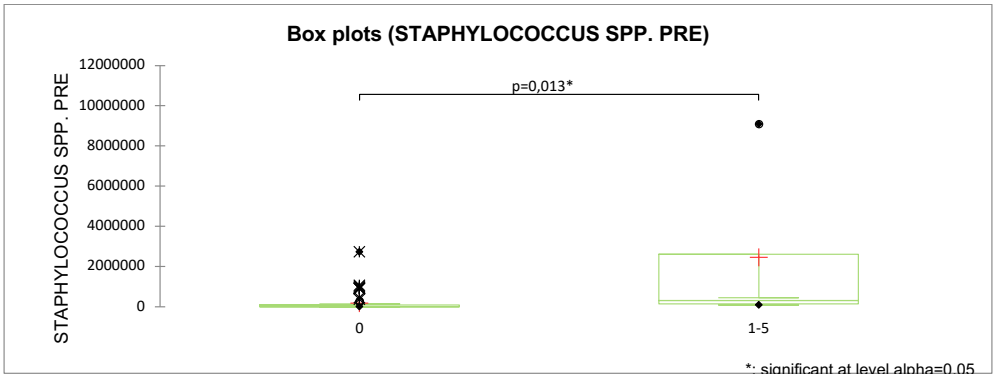


Figura 2: prevalenza di OXA pre-lavaggio in relazione alla carica di *Staphylococcus spp.* 0 = Assenza di colonie OXA; 1-5 = numero di colonie OXA compreso tra 1 e 5.
Figure 2: correlation between *Staphylococcus spp.* load and OXA prevalence. 0 = Absence of OXA; 1-5 = number of OXA colonies between 1 and 5.

La prevalenza di resistenza ai carbapenemi (CRE) è stata del 10,5% pre-lavaggio, mentre si è azzerata dopo le operazioni di pulizia. In caso di elevata carica batterica di *Staphylococcus* spp., la classe di positività più rappresentata tra i CRE è quella di 1-5 colonie (P = 0,047). Un numero maggiore di colonie (5-25) era presente anche con cariche basse di *Staphylococcus spp*. (Figura 3).

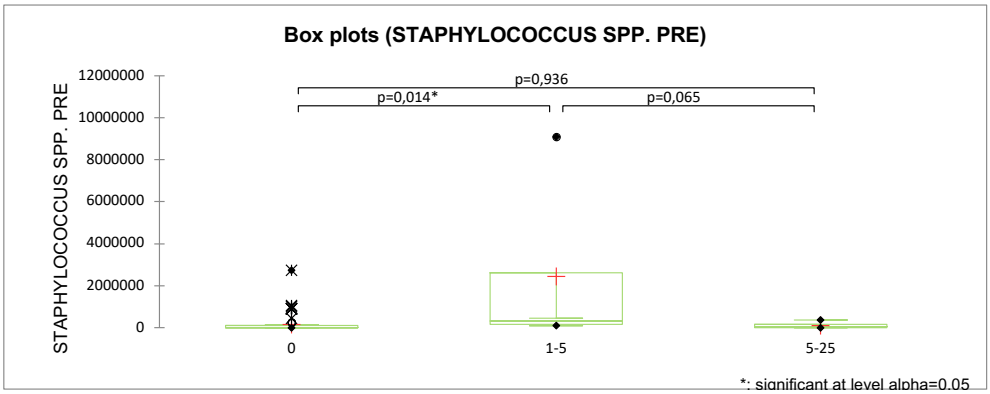


Figura 3: prevalenza di CRE pre-lavaggio in relazione alla carica di *Staphylococcus spp.* 0 = Assenza di colonie CRE; 1-5 = numero di colonie CRE compreso tra 1 e 5; 5-25 = numero di colonie CRE compreso tra 5 e 25.
Figure 3: correlation between *Staphylococcus spp.* load and CRE prevalence. 0 = Absence of CRE; 1-5 = number of CRE colonies between 1 and 5; 5-25 = number of CRE colonies between 5 and 25.

La prevalenza di vancomicina-resistenza (VRE) è stata del 49,4% pre-lavaggio, rimanendo elevata (26,3%) anche dopo la pulizia. In fase pre-lavaggio, la resistenza più frequente è stata riscontrata in *Enterococcus gallinarum*, mentre post-lavaggio in *Enterococcus* spp. Campioni con cariche maggiori di *Enterococcus* spp. sono state riscontrate in assenza di vancomicina-resistenza (P = 0,022). Post-lavaggio si è osservato un numero maggiore di colonie resistenti alla

vancomicina in caso di basse cariche di *Staphylococcus* spp. (P = 0,032) (Figura 4).
La prevalenza di ESBL è stata del 45% pre-lavaggio, rimanendo elevata (20%) anche post-lavaggio. Questa numerosità non è stata riscontrata necessariamente in caso di cariche elevate. Anzi, campioni con cariche maggiori di *Enterococcus* spp. sono state riscontrate in assenza di ESBL (P = 0,025) (Figura 5).
La prevalenza di meticillino-resistenza (ORSAB) è 55% pre-lavaggio, rimanendo elevata (45%) dopo le operazioni di pulizia. La resistenza più frequente è stata riscontrata in *Staphylococcus* spp. La presenza di cariche elevate di *Staphylococcus* spp. determina un maggior riscontro di campioni con 5-25 colonie resistenti (P = 0,025). Un numero maggiore di colonie resistenti non sembra manifestarsi con cariche elevate. Anche in presenza di elevate cariche mesofile si è osservata l'assenza di meticillino-resistenza (P = 0,006). Sicuramente, la presenza di meticillino-resistenza post lavaggio ha mostrato maggiori differenze a seconda della carica batterica pre-lavaggio. Campioni con cariche maggiori di *Enterococcus* spp. e mesofili pre-lavaggio sono state riscontrate in assenza di meticillino-resistenza post lavaggio (P = 0,018 e 0,008 rispettivamente) (Figure 6-7). Analogamente, campioni con cariche maggiori di *Staphylococcus* spp. pre-lavaggio corrispondevano a un basso numero di colonie meticillino-resistenti post lavaggio (P = 0,015) (Figura 8).

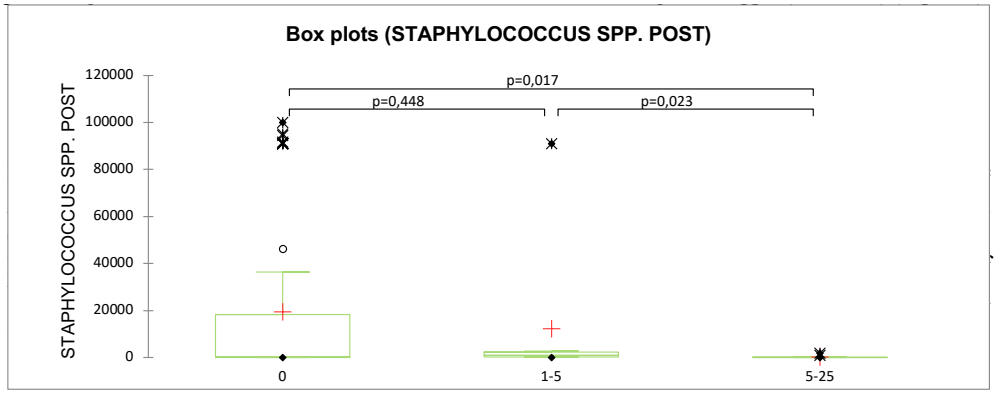


Figura 5: prevalenza di ESBL pre-lavaggio in relazione alla carica di *Enterococcus* spp. 0 = Assenza di colonie ESBL; 1-5 = numero di colonie ESBL compreso tra 1 e 5; 5-25 = numero di colonie ESBL compreso tra 5 e 25; >25 = numero di colonie ESBL maggiore di 25.
Figure 5: correlation between *Enterococcus* spp. load and ESBL prevalence. 0 = Absence of VRE; 1-5 = number of VRE colonies between 1 and 5; 5-25 = number of VRE colonies between 5 and 25; >25 = number of VRE colonies greater than 25.

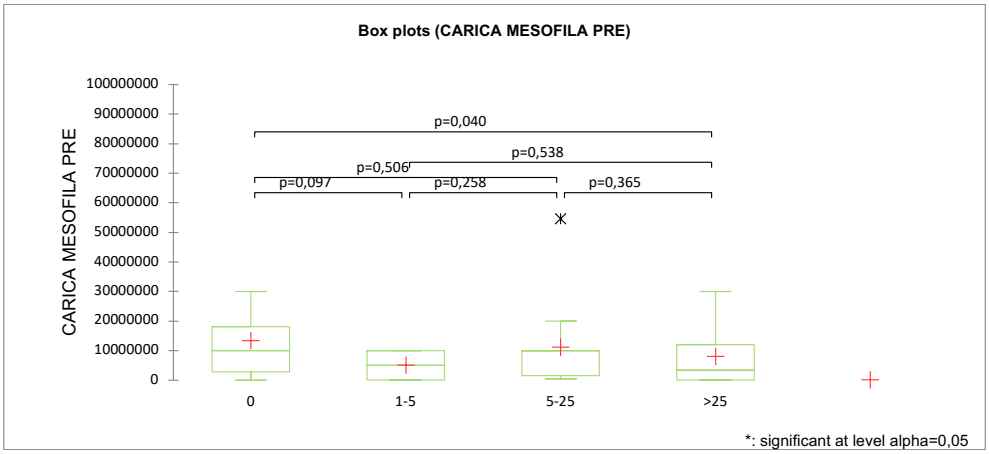


Figura 6: prevalenza di ORSAB post-lavaggio in relazione alla carica mesofila totale pre-lavaggio. 0 = Assenza di colonie ORSAB; 1-5 = numero di colonie ORSAB compreso tra 1 e 5; 5-25 = numero di colonie ORSAB compreso tra 5 e 25; >25 = numero di colonie ORSAB maggiore di 25.
Figure 6: correlation between total mesophilic load before cleaning and disinfection procedures and ORSAB prevalence after cleaning and disinfection procedures. 0 = Absence of ORSAB; 1-5 = number of ORSAB colonies between 1 and 5; 5-25 = number of ORSAB colonies between 5 and 25; >25 = number of ORSAB colonies greater than 25.

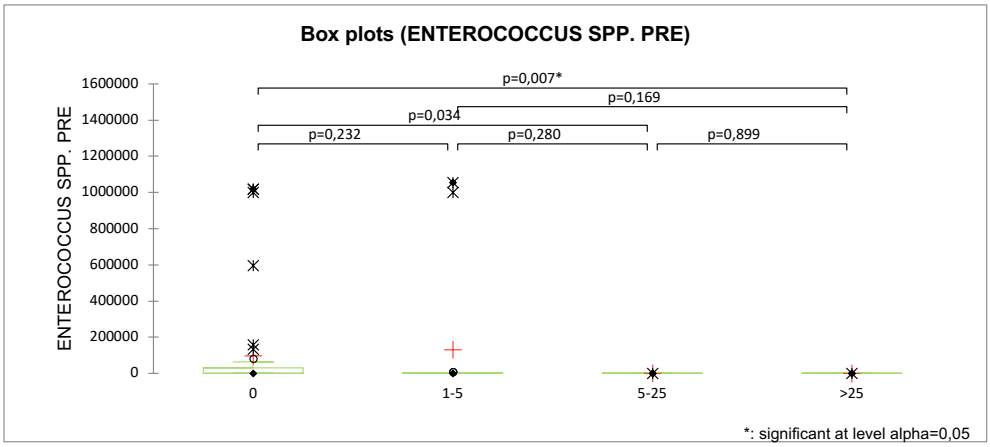


Figura 7: prevalenza di ORSAB post-lavaggio in relazione alla carica di *Enterococcus* spp. pre-lavaggio. 0 = Assenza di colonie ORSAB; 1-5 = numero di colonie ORSAB compreso tra 1 e 5; 5-25 = numero di colonie ORSAB compreso tra 5 e 25; >25 = numero di colonie ORSAB maggiore di 25.
Figure 7: correlation between *Enterococcus* spp. load before cleaning and disinfection procedures and ORSAB prevalence after cleaning and disinfection procedures. 0 = Absence of ORSAB; 1-5 = number of ORSAB colonies between 1 and 5; 5-25 = number of ORSAB colonies between 5 and 25; >25 = number of ORSAB colonies greater than 25.

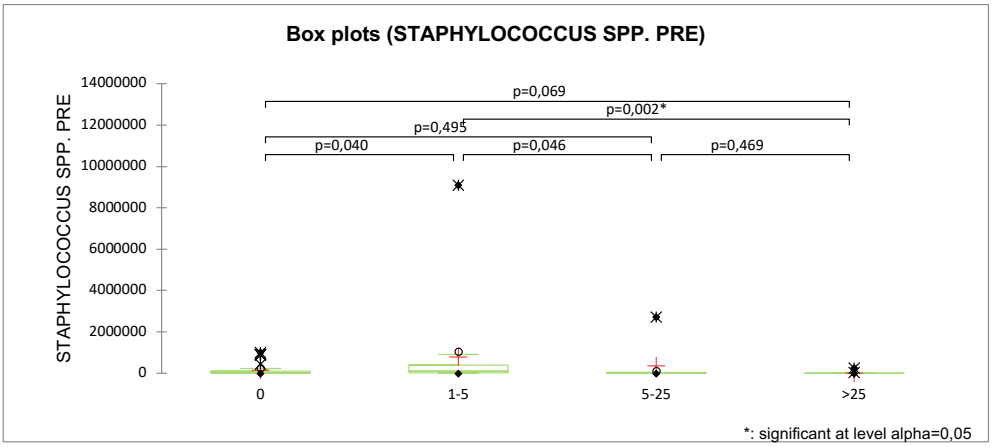


Figura 8: prevalenza di ORSAB post-lavaggio in relazione alla carica di *Staphylococcus* spp. pre-lavaggio. 0 = Assenza di colonie ORSAB; 1-5 = numero di colonie ORSAB compreso tra 1 e 5; 5-25 = numero di colonie ORSAB compreso tra 5 e 25; >25 = numero di colonie ORSAB maggiore di 25.

Figure 8: correlation between *Staphylococcus* spp. load before cleaning and disinfection procedures and ORSAB prevalence after cleaning and disinfection procedures. 0 = Absence of ORSAB; 1-5 = number of ORSAB colonies between 1 and 5; 5-25 = number of ORSAB colonies between 5 and 25; >25 = number of ORSAB colonies greater than 25.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Per indagare la presenza di resistenze antibiotiche negli ambienti suinicoli, sono stati selezionati in questo studio determinati biomarkers con caratteristiche peculiari. Per quanto riguarda gli enterobatteri, il principale meccanismo di resistenza è dato dalla produzione di β-lattamasi, enzimi che degradano l'anello β-lattamico inattivando l'antibiotico. Attualmente, gli enzimi più importanti dal punto di vista clinico, per epidemiologia e implicazioni di resistenza, sono le β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), le β-lattamasi di tipo AmpC e le carbapenemasi (CRE) (Viaggi, 2018). Anche lo *Staphylococcus aureus* è un batterio potenzialmente patogeno per animali e uomo. Tra i batteri antimicrobico-resistenti MRSA è il più frequentemente isolato (Grundmann, 2006). Esso è resistente a quasi tutti i beta-lattamici oltre che ad altre classi di antimicrobici (Guardabassi, et al., 2013). Studi italiani riportano una prevalenza di aziende suinicole positive a LA-MRSA del 34.9-38.1% (A. Battisti, 2010). Un altro studio condotto all'interno di impianti di macellazione ha evidenziato che il 37.6% dei suini erano portatori di MRSA, e alcuni dei ceppi isolati erano uguali a quelli riscontrati nel personale del macello (Giovanni Normanno, 2015). La possibile trasmissione zoonotica di questi batteri rappresenta un problema molto rilevante non solo come malattia occupazionale (Frieder Schaumburg, 2012) ma anche per le persone non a contatto diretto con gli animali. È infatti stata dimostrata la trasmissione interumana o attraverso ambienti contaminati ad esempio attraverso la polvere ((EFSA), 2009). È inoltre descritta la trasmissione per via alimentare attraverso il consumo di carni contaminate durante il processo di macellazione di animali portatori di MRSA (Kluytmans, 2010). Questi batteri vengono frequentemente eliminati attraverso le feci, oltre che dalle narici. Questo aspetto rende rilevante l'utilizzo del materiale fecale come screening per rilevazione di ceppi MRSA (István Szabó, 2012). Infine, anche per gli enterococchi sono riportate resistenze antibiotiche. Normalmente gli enterococchi non sono patogeni per l'uomo, ma alcune specie sono responsabili di infezioni nosocomiali in pazienti ospedalizzati ed immunocompromessi (Gregory H Tyson, 2018); essi sono responsabili del 10% delle infezioni batteriche contratte

in ambiente ospedaliero (Theodoros Kelesidis, 2011). Lo sviluppo di antimicrobico-resistenza sembra contribuire in maniera sostanziale all'aumento della morbilità e della mortalità delle infezioni causate dagli enterococchi (Pfaller M.A., 2019). Gli enterococchi isolati più spesso da campioni clinici ed alimentari, in ambito umano, sono *E. faecalis* ed *E. faecium* (Billington, et al., 2014). Le vie di trasmissione principali sono il contatto diretto tra persone e la contaminazione ambientale ed alimentare (Franz, et al., 1999). La principale fonte di infezione da *E. faecalis* e *E. faecium* per veterinari, allevatori ed operatori degli impianti di macellazione è il contatto diretto con gli animali (Grudlewska-Buda, 2023). Uno studio condotto in diversi allevamenti suini ha evidenziato che il 25.5% dei campioni ambientali era positivo a *E. faecalis* e l'8.2% a *E. faecium*. Il maggior numero di positività è stato riscontrato all'interno del materiale fecale (Grudlewska-Buda, 2023). Queste specie sono generalmente resistenti a molte classi di antimicrobici (Woodford & Livermore, 2009).

In allevamento la presenza di ESBL e MRSA dipende, oltre che dalle modalità di utilizzo degli antibiotici, anche dal quantitativo di polvere e feci presenti nell'ambiente; pertanto, l'applicazione di protocolli igienici appropriati riduce il rischio di colonizzazione da parte di batteri antimicrobico-resistenti (Friese, 2012) (Laube, 2013).

Nel presente studio, la prevalenza negli ambienti sporchi (prelavaggio) di ESBL è risultata del 45%, in linea con altri studi che evidenziavano prevalenze di 30% (Scollo, 2023) o comprese tra 3,2 e 35,0% (Schmithausen, 2015) (W Dohmen, 2015). Diversamente, il rapporto EFSA 2011 mostrava una prevalenza media del 2,3% in diversi paesi europei. Nel post lavaggio, questo studio ha evidenziato una prevalenza di ESBL inferiore rispetto a quella pre-lavaggio, ma ancora decisamente alta (30%). Questo risultato è in disaccordo con quanto evidenziato da studi precedenti (Scollo, 2023) (Schmithausen, 2015) che ne riportavano una riduzione più marcata in seguito alle procedure igieniche.

Alta anche la prevalenza di MRSA pre-lavaggio riscontrata nel presente lavoro, ovvero del 55%, in linea con i risultati ottenuti da lavori analoghi (Scollo, 2023) (M. Bonvegna, 2021) che riportavano prevalenze di 67,5% e 64,6%, ma diversamente da un altro studio che aveva evidenziato prevalenze inferiori: 6,7% in ambiente e 17,5% su campioni animali (Pedro Rodríguez-López, 2020).

Come per gli ESBL, anche per MRSA abbiamo osservato una scarsa riduzione delle cariche post-lavaggio (da 55 a 45%). Questo risultato è in linea con alcuni lavori precedenti che riscontravano una scarsa efficacia della decontaminazione degli allevamenti da MRSA a causa della ri-contaminazione effettuata ad opera degli animali (Lozano, et al., 2011) (Pletinckx, et al., 2013). Diversamente altri lavori hanno osservato una sostanziale riduzione della carica di MRSA dopo l'applicazione di routinarie procedure di pulizia e disinfezione (da 85% a 2%) (Iris Kobusch, 2020). Poiché gli MRSA possono essere trasmessi attraverso l'aria e la polvere e diffusi tramite i sistemi di ventilazione o stivali e indumenti contaminati, non è da escludere la possibilità di ri-contaminazione degli ambienti successivamente al lavaggio (Iris Kobusch, 2020). Inoltre, la scelta di disinfettanti inappropriati potrebbe essere responsabile del fallimento. Infine, gli MRSA sono produttori di biofilm, che determina un'elevata persistenza ambientale (Derek E Moormeier, 2017).

Anche gli enterococchi possono formare biofilm, ed in particolar modo i ceppi antimicrobico-resistenti. In uno studio condotto in Polonia è emerso che tutti i ceppi vancomicina-resistenti di *E. faecalis* ed *E. faecium* producevano maggiormente biofilm rispetto ai ceppi sensibili (Katarzyna Grudlewska-Buda, 2023). Nel presente studio è stata individuata una prevalenza di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) del 49,9% pre-lavaggio e del 26,6% post lavaggio, in accordo con altri studi precedenti che evidenziavano la persistenza dei ceppi VRE negli allevamenti avicoli anche dopo lo svuotamento e la sanificazione dei capannoni (Borgen K., 2000). Uno studio retrospettivo ha analizzato campioni di polvere ambientale in allevamenti bovini, suini ed avicoli, riscontrando un'elevata prevalenza enterococchi multi-resistenti (M. Liu, 2018).

Diversamente dai batteri sopra-citati, i produttori di carbapenemasi (OXA) e quelli resistenti ai carbapenemi (CRE) hanno evidenziato un azzeramento delle cariche in seguito alla pulizia degli ambienti.
Relativamente al livello di pulizia degli allevamenti, quantificabile attraverso la carica batterica, non sembra esserci quasi mai correlazione tra la presenza di cariche elevate, indicatrici di scarsa igiene, ed il riscontro di batteri antimicrobico-resistenti. In alcuni casi più rari, il riscontro di colonie resistenti corrispondeva a cariche batteriche più elevate, soprattutto in fase pre-lavaggio come ad esempio per la prevalenza di batteri OXA e cariche batteriche maggiori di *Staphylococcus* spp. In molti altri casi, i risultati hanno evidenziato che, in presenza di cariche batteriche elevate, la prevalenza di batteri resistenti era bassa o assente. Una possibile spiegazione alla scarsa riduzione di batteri antimicrobico-resistenti dopo la disinfezione potrebbe essere ricondotta al fatto che gli allevamenti campionati non abbiano utilizzato protocolli di sanificazione specifici e mirati. I risultati ottenuti sembrano quindi suggerire che procedure standard di sanificazione non siano sufficienti ad azzerare le cariche dei batteri resistenti. Inoltre, alcuni di questi batteri potrebbero essere resistenti anche ai principi attivi dei disinfettanti. In molti casi, lo sviluppo di resistenza è conseguenza di scorrette modalità di stoccaggio e utilizzo delle formulazioni biocide, che esita in una riduzione della concentrazione efficace, fondamentale per garantire l'effetto biocida (C., 2000). Lo sviluppo di resistenza a queste soluzioni può aumentare attraverso la selezione, ad esempio per esposizioni ripetute a concentrazioni scorrette del biocida.
Un approccio per affrontare questo problema potrebbe essere quello di effettuare più spesso di quanto non si faccia attualmente tamponi ambientali per monitorare il livello di antimicrobico-resistenza in allevamento. Da questi dati si potrebbero ottenere informazioni utili ad impostare protocolli di disinfezione mirati. La necessità di trovare soluzioni per contrastare l'antimicrobico-resistenza negli ambienti di allevamento diventa fondamentale se osservata da una prospettiva "One Health", che mette in evidenza i rischi professionali cui sono sottoposti allevatori, veterinari e le persone direttamente o indirettamente a contatto con gli ambienti di allevamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Agüeria D., Libonatti C., Civit D. (2021) "Cleaning and disinfection programmes in food establishments: A literature review on verification procedures." *Journal of Applied Microbiology.* 131, 23–35.
2. Battisti A., Franco A., Merialdi G., Hasman H., Iurescia M., Lorenzetti R., Feltrin F., Zini M., Aarestrup F.M. (2015) "Heterogeneity among methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Italian pig finishing holdings". *Vet. Microbiol.,* 142, 361-366.
3. Becker K., Ballhausen B., Köck R., Kriegeskorte A. (2014) "Methicillin resistance in Staphylococcus isolates: The "mec alphabet" with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic S. aureus lineages". *Int. J. Med. Microbiol.,* 304:7, 794-804.
4. Billington E., Phang S., Gregson D., Pitout J., Ross T., Church D., Laupland K., Parkins E. (2014) "Incidence, risk factors, and outcomes for Enterococcus spp. bloodstream infections: A population-based study." *Int. J. Infect. Dis.,* 26, 76-82.
5. Bonvegna M., Grego E., Sona B., Stella M. C., Nebbia P., Mannelli A., Tomassone L. (2021) "Occurrence of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci (MR-CoNS) and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from Pigs and Farm Environment in Northwestern Italy". *Antibiot. j.,* 10:6, 676.
6. Borgen K., Sørum M., Kruse H., Wasteson Y. (2000) "Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) on Norwegian broiler farms." *FEMS Microbiol. Lett.,* 191:2, 255–258.

7. Brisola M.C., Crecencio R.B., Bitner D.S., Frigo A., Rampazzo L., Stefani, L.M. Faria, G.A. (2019) "Escherichia coli used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil". *Sci. Total Environ.* 647, 362-368.
8. De Lorenzi G., Borella L., Alborali G.L., Prodanov-Radulović J., Štukelj M., Bellini S. (2020) "African swine fever: A review of cleaning and disinfection procedures in commercial pig holdings". *Research in Veterinary Science.* 132, 262–26.
9. Deiters C., Günnewig V., Friedrich A.W., Mellmann A., Köck R. (2015) "Are cases of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal complex (CC) 398 among humans still livestock-associated?" *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 110-113.
10. Derek E. Moormeier, Kenneth W Bayles (2017) "Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism" *Mol. Microbiol.* 105, 365-376.
11. Dohmen W., Bonten M. J. M., Bos M. E. H., van Marm S., Scharringa J., Wagenaar J. A., Heederik D. J. J. (2015) "Carriage of extended-spectrum β-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs" *Clin. Microbiol. infect.,* 21:10, 917-23.
12. E. F. S. A. (EFSA) (2009) "Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in holdings with breeding pigs in the EU". *EFSA Journal,* 7: 11, 1376.
13. Fischer J., Hille K., Ruddat I., Mellmann A., Köck R., Kreienbrock L. (2017) "Simultaneous occurrence of MRSA and ESBL-producing Enterobacteriaceae on pig farms and in nasal and stool samples from farmers". *Vet. Microbiol.* 18, 107-113.
14. Franz C., Holzapfel W., Stiles M. (1999) "Enterococci at the crossroads of food safety?" *Int. J. Food Microbiol.,* 47, 1-24.
15. 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". *Vet. Microbiol.,* 158, 129–135.
16. Gradel K.O., Sayers A.R. Davies (2004) "Surface disinfection tests with Salmonella and a putative indicator bacterium, mimicking worst-case scenarios in poultry houses". *Poult. Sci.,* 83, 1636-1643.
17. Grudlewska-Buda K., Skowron K., Bauza-Kaszewska J., Budzyńska A., Wiktorczyk-Kapischke N., Wilk M., Wujak M., Paluszak Z. (2023) "Assessment of antibiotic resistance and biofilm formation of Enterococcus species isolated from different pig farm environments in Poland." *BMC Microbiol.,* 23, 89.
18. Grudlewska-Buda K., Skowron K., Bauza-Kaszewska J., Budzyńska A., Wiktorczyk-Kapischke N., Wilk M., Wujak M., Paluszak Z. (2023) "Assessment of antibiotic resistance and biofilm formation of Enterococcus species isolated from different pig farm environments in Poland" *BMC Microbiol.,* 23, 89.
19. Grundmann H., Tiemersma E. (2006) "Global prevalence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus". *Lancet,* 368, 1866–1867.
20. Guardabassi L., Larsen J., Weese J., Butaye P., Battisti A., Kluytmans J., Lloyd D. e Skov R. (2013) "Public health impact and antimicrobial selection of meticillin-resistant staphylococci in animals". *J. Glob. Antimicrob. Resist.,* 1, 55–62.
21. Halkman A., Halkman A. (2014) "Indicator Organisms" in *Encyclopedia of Food Microbiology*, Carl A. Batt, Richard K. Robinson, Carl A. Batt. 358-363.
22. Kelesidis T., Humphries R., Uslan D.Z., Pegues D.A. (2011) "Daptomycin Non-susceptible Enterococci: An Emerging Challenge for Clinicians" *Clin. Infect. Dis.,*52:2, 228–234.
23. Kluytmans J.A.J.W. (2010) "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in food pro-

ducts: cause for concern or case for complacency?" *Clin. Microbiol. Infect.,* 16, 11-15.
24. Kobusch I., Müller H., Mellmann A., Köck R., Boelhauve M. (2020) "Single blinded study on the feasibility of decontaminating LA-MRSA in pig compartments under routine conditions" *Antibiotics,* 9, 4, 141.
25. Laube H., Friese A., von Salviati C., Guerra B., Käsbohrer A., Kreienbrock L., Roesler U. (2013) "Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing Escherichia coli at German broiler chicken fattening farms." *Appl Environ. Microbiol.,* 79, 4815-4820.
26. Liu M., Kemper N., Volkmann N., Schulz J. (2018) "Resistance of Enterococcus spp. in dust from farm animal houses: a retrospective study" *Front. Microbiol.,* 9.
27. Lozano C., Aspiroz C., Lasarte J., Gómez-Sanz E., Zarazaga M., Torres C. (2011) "Dynamic of nasal colonization by methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 and ST1 after mupirocin treatment in a family in close contact with pigs." *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.,* 34, 1-7.
28. Luyckx K., Dewulf J., Van Weyenberg S., Herman L., Zoons J., Vervaet E., M. Heyndrickx M., De Reu K. (2015) "Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses." *Poult. Sci.* 94, 740-9.
29. Normanno G., Dambrosio A., Lorusso V., Samoilis G., Di Taranto P., Parisi A. (2015) "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy". *Food Microbiol.,* 51, 51-56.
30. Pfaller M.A., Cormican M., Flamm R.K., Mendes R.E., Jones R.N. (2019) "Temporal and geographic variation in antimicrobial susceptibility and resistance patterns of enterococci: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program" *Open Forum infect. dis.* 6, 54-62.
31. Pletinckx L., Dewulf J., de Bleecker Y., Rasschaert G., Goddeeris B., de Man I. (2013) "Effect of a disinfection strategy on the methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 prevalence of sows, their piglets and the barn environment." *J. Appl. Microbiol.,* 114, 1634-1641.
32. Rochelle-Newall E., Nguyen T.M., Sengtaheuanghoung O., Ribolzi O. (2015) "A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions." *Front. Microbiol.* 6, 308.
33. 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". *Foods,* 19:9, 1141.
34. Russell C. A. D. e Mc Donnel (2000) "Concentration: a major factor in studying biocidal action." *J. Hosp. Infect.,* 44:1, 1-3.
35. Schaumburg F., Köck R., Mellmann A., Richter L., Hasenberg F., Kriegeskorte A., W. Friedrich A., Gatermann S., Peters G., von Eiff C., Becker K. (2012) "Population Dynamics among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates in Germany during a 6-Year Period" *J. Clin. Microbiol.* 50:10, 3186–3192.
36. Schmithausen R.M., Kellner S.R., Schulze-Geisthoevel S.V., Hack S., Engelhart S., Bodenstein I., Bekeredjian-Ding I. (2015) "Eradication of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and of Enterobacteriaceae expressing extended-spectrum beta-lactamases on a mode pig farm". *AEM,* 81:21, 7633-7643.

37. Scollo A., Perrucci A., Stella M.C., Ferrari P., Robino P., Nebbia P. (2023) “Biosecurity and Hygiene Procedures” in Pig Farms: Effects of a Tailor-Made Approach as Monitored by Environmental Samples.,» *Animals,* 13, 1262.
38. Szabó I., Beck B., Friese A., Fetsch A., Tenhagen B., Roesler U. (2012) “Colonization Kinetics of Different Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Sequence Types in Pigs and Host Susceptibilities”. *ASM Journals,* 78:2, 541-548.
39. Threlfall E.J., Ward L.R., Frost J.A., Willshaw G.A. (2000) “The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria”. *Int. J. Food Microbiol.,* 62, 1-5.
40. Tyson G.H., Sabo J.L., Rice-Trujillo C., Hernandez J., McDermott P.F. (2011) “Whole-genome sequencing based characterization of antimicrobial resistance in Enterococcus”. *FEMS journals,* 76,2.
41. Viaggi B., Tascini C., Rossolini (2018) “Dal laboratorio alla clinica in *Enterobacterales multiresistenti”* Edizioni Internazionali srl - Edizioni Medico-Scientifiche.
42. Woodford N. e Livermore D. (2009) “Infections caused by gram-positive bacteria: A review of the global challenge”. *J. Infect.,* 59, 4-16.
43. Zaheer R., Cook, S.R., Barbieri R., Goji N., Cameron A., Petkau A., Ortega Polo R., Tymensen L., Stamm C., Song J., Hannon S., Jones T., Church D., Booker C.W., Amoako K., Van Domselaar G., Read R.R., McAllister T.A. (2020). “Surveillance of Enterococcus spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum”. Sci. Rep., 10, 3937.

PREMIO
CASIMIRO TAROCCO 2024

VINCITORE

ADDITIVI FUNZIONALI PER LA SALUTE ANIMALE

FUNCTIONAL FEED ADDITIVES FOR ANIMAL HEALTH

DELL'ANNO M., ROSSI L.

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali – DIVAS, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: alternative agli antibiotici, nutrizione funzionale, salute animale
Keywords: alternatives to antibiotics, functional nutrition, animal health

Riassunto
Gli additivi funzionali agiscono positivamente nei confronti di infezioni, salute e performance degli animali. Questo lavoro di tesi di dottorato ha avuto come obiettivo quello di valutare additivi funzionali innovativi (alghe, estratto di tannini, leonardite, tributirrina e probiotici) come alternative agli antibiotici, valutando il loro impatto sulla salute e crescita dei suinetti svezzati attraverso approcci *in vitro, in vivo* ed *ex vivo*. I metodi *in vitro* hanno permesso di caratterizzare gli additivi per i loro effetti antimicrobici, antiossidanti, e la loro interazione con le cellule intestinali. Gli studi *in vivo* hanno valutato l'effetto sulla salute, crescita e modulazione del microbiota in suinetti svezzati. I risultati hanno rivelato molteplici proprietà bioattive degli additivi, impatti positivi sulle performance, riduzione dell'incidenza di diarrea e modulazione del microbiota. Non tutti i composti hanno migliorato le performance, sebbene abbiano ridotto i disturbi gastrointestinali. Infine, è stato sviluppato un modello di intestinale di suino riperfuso per studiare la bioaccessibilità dei nutrienti, in linea con i principi delle 3R. L'integrazione della dieta con additivi funzionali può contribuire in modo significativo a ridurre l'insorgenza di patologie, migliorare la salute e la crescita degli animali, riducendo l'uso di antibiotici. L'uso di additivi funzionali si configura come un'interessante alternativa in linea con i principi di "One Health".

Abstract
Functional feed additives with antibacterial and antioxidant properties play a crucial role in countering infections, enhancing animal health, and optimizing host functions. This PhD project aimed to evaluate innovative functional feed additives (algae, tannin extract, leonardite, tributyrin, and probiotics) as alternatives to antibiotics, focusing on their impact on health, performance in weaned piglets through *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* approaches. *In vitro* methods characterized additives for antimicrobial and antioxidant effects, while cell cultures predicted their interaction with the intestinal epithelium. *In vivo* trials assessed additives effect on health and performance in weaned piglets. Results revealed multiple bioactive properties, positive impacts on performance, reduced diarrhoea occurrence, improved health status, and microbiota modulation. Not all additives consistently boosted growth performance *in vivo*, though they notably reduced gastrointestinal disorders. Lastly, an *ex vivo* swine intestinal perfusion model was developed to study nutrient bioaccessibility, aligning with the 3R principles. Dietary approaches with functional feed additives significantly contribute to decreasing pathology occurrence, enhancing animal health and performance, thereby reducing antibiotic use. The use of functional feed additives presents a valuable alternative by preventing multifactorial disorders in swine farming, in line with One Health principles.

Premessa

Di seguito sono presentati tre principali articoli che rappresentano una particolare innovazione nel campo della nutrizione funzionale e della riduzione dell'incidenza di patologie, l'aumento delle performance degli animali e miglioramento della sostenibilità della produzione suinicola. I tre studi sono stati riassunti al fine di fornire una breve introduzione, una rapida descrizione dei principali metodi utilizzati e i risultati con relativa discussione dei parametri più interessanti emersi dalle prove condotte *in vivo*. Dettagli ulteriori insieme alla presentazione completa di tutti gli studi disponibili sono disponibili all'interno della tesi di dottorato. Il contributo per il seguente estratto è stato tradotto in italiano condensando tre diversi articoli scientifici inclusi nella tesi di dottorato per la pubblicazione negli Atti della SIPAS 2024.

INTRODUZIONE

La leonardite è un prodotto di derivazione microbica principalmente composto da acidi umici (HAs), che originano dalla decomposizione della materia organica, generalmente utilizzato per la fertilizzazione del suolo. Il suo impiego in nutrizione ha mostrato attività protettive nei confronti della mucosa intestinale, con proprietà anti-infiammatorie, antiflogistiche e antitossiche (Islam et al., 2005). Le sostanze umiche naturali possono apportare benefici alla salute dei suinetti durante il post-svezzamento (Trckova et al., 2017). Gli acidi umici hanno mostrato proprietà antiossidanti che potrebbero supportare gli animali durante il periodo stressante dello svezzamento. Hanno inoltre dimostrato attività antimicrobica contro patogeni, riducendo l'incidenza di diarrea e una migliorando la crescita dei suinetti (Wang et al., 2008). Gli acidi umici e i loro sali di sodio sono autorizzati per l'uso orale (livello di inclusione: 500-2000 mg/kg di peso corporeo) in cavalli, ruminanti, suini e avicoli per il trattamento di diarrea, dispepsia e intossicazioni acute (EGTOP/1/, 2011). Sebbene siano stati riportati risultati incoraggianti riguardanti l'uso di HAs come strumento preventivo per i disturbi intestinali, l'inclusione di leonardite come additivo per mangimi per promuovere la crescita non è stata ampiamente indagata. Lo scopo del primo studio è quindi stato valutare l'effetto dell'integrazione nella dieta di leonardite allo 0,25%, come materiale naturale ricco di HAs, sui principali parametri metabolici e sulle performance di crescita nei suinetti svezzati.

I tannini possiedono proprietà antiossidanti e antimicrobiche e vengono utilizzati per migliorare le performance di crescita e ridurre l'incidenza di diarrea, particolarmente durante il periodo post-svezzamento nel suinetto, attraverso i loro effetti antimicrobici e citomodulatori sulle cellule intestinali (Reggi et al., 2020). L'integrazione dello 0,20% di tributirrina è stata dimostrata in grado di potenziare le performance degli animali, il metabolismo lipidico e la salute intestinale attraverso un aumento del metabolismo energetico dei batteri enterici e la promozione della ricchezza del microbiota correlata positivamente alle performance degli animali e alla funzione immunitaria mucosale (Sotira et al., 2020). A seguito dei risultati incoraggianti ottenuti nei nostri studi precedenti (Caprarulo et al., 2020; Dell'Anno et al., 2020; Reggi et al., 2020) dall'integrazione dei singoli additivi, lo scopo del secondo studio è stato quello di valutare i possibili effetti della combinazione di estratti di tannino di quebracho e castagno, leonardite e tributirrina sulla salute degli animali e sulla modulazione del microbiota nei suinetti svezzati.

Lactobacillus plantarum è incluso nel registro europeo degli additivi per mangimi (Regolamento CE 1831/2003) come conservante (1; a), additivo per l'insilamento (1; k), microorganismi (1; k) e stabilizzatore della flora intestinale per polli (4; b). Parallelamente, *Lactobacillus reuteri* è stato incluso nel registro degli additivi per mangimi dell'UE come microorganismo (1; k) fino al suo ritiro nel 2012 a causa della mancanza della documentazione

richiesta per il rinnovo. Questo microorganismo non è considerato pericoloso e non sono stati menzionati problemi legati alla sua sicurezza nella decisione della Commissione UE (Regolamento UE 451/2012), poiché è incluso nell'elenco di "Qualified Presumption of Safety" (QPS) dell'Unione Europea. Poiché pochi studi hanno valutato gli effetti dei ceppi di *L. plantarum* e *L. reuteri* e la loro sinergia attraverso una vasta gamma di combinazioni batteriche e livelli di integrazione, sono necessari ulteriori studi per chiarire le proprietà funzionali e il livello di inclusione ottimale di questi due ceppi batterici nella prevenzione della diarrea nei suinetti svezzati. Lo scopo del terzo studio è stato quello di valutare *L. plantarum*, *L. reuteri* e se la loro integrazione combinata possedesse effetti sinergici o meno nella prevenzione della diarrea nei suinetti svezzati.

MATERIALI E METODI

Studio 1: Leonardite

Lo studio è stato approvato dall'Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA) dell'Università degli Studi di Milano (autorizzazione n. 31_2019). Un totale di 120 suinetti ibridi (Large White × Landrace), svezzati a 28 ± 2 giorni (50% femmine e 50% maschi), sono stati alloggiati in 12 box in condizioni ambientali omogenee (27 °C e 60% di umidità relativa) per 40 giorni. Al fine di garantire un peso omogeneo, i suinetti (10 animali/box) sono stati assegnati casualmente al gruppo di controllo (CTRL: 6 box, 10 suinetti/box) alimentato con dieta commerciale e al gruppo di trattamento alimentato con la stessa dieta commerciale integrata con il 0,25% di leonardite (HAG: 6 box, 10 suinetti/box). Dopo 40 giorni, sono stati selezionati casualmente 4 animali/box per il prelievo di sangue dalla vena giugulare con provette sottovuoto senza anticoagulanti. I campioni di sangue sono stati lasciati coagulare per 2 ore a temperatura ambiente. Il siero è stato ottenuto per centrifugazione e valutato mediante un autoanalizzatore multiparametrico per la chimica clinica per determinare la concentrazione di: proteine totali, albumina, globulina, rapporto albumina/globulina (A/G), urea, alanina aminotransferasi (ALT-GPT), aspartato aminotransferasi (AST-GOT), fosfatasi alcalina (ALP), bilirubina totale, glucosio, colesterolo totale, calcio (Ca), fosforo (P), magnesio (Mg), trigliceridi totali, lipoproteine ad alta densità (HDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e creatinina.

Studio 2: Mix di additivi

Il seguente studio è stato approvato dall'OPBA dell'Università degli Studi di Milano (autorizzazione n. 09_2020) e condotto in conformità con le normative europee (Dir. EU 63/2010). Un totale di 168 suinetti svezzati (Landrace × Large White) è stato distribuito casualmente in due gruppi sperimentali (6 box/gruppo, 14 suinetti/box). Gli animali sono stati alimentati con una dieta commerciale nel gruppo controllo (CTRL) e la stessa dieta di trattamento (MIX) integrata con 0,75% di estratti di tannino, 0,25% di leonardite e 0,20% di tributirrina per 28 giorni, basandosi su studi precedenti (Caprarulo et al., 2020; Dell'Anno et al., 2020; Sotira et al., 2020). I campioni fecali sono stati raccolti al giorno 0 e 28 dall'ampolla rettale di quattro suinetti per box selezionati casualmente (24 suinetti CTRL, 24 suinetti MIX). La consistenza fecale dei quattro suinetti campionati **è stata valutata settimanalmente utilizzando una scala a quattro livell**i. Un punteggio di consistenza fecale ≤ 1 (0,1) è stato considerato normale, mentre un punteggio fecale >1 (2,3) è stato definito come diarrea. L'amplificazione del DNA è stata eseguita per la regione V3-V4 del gene 16S rRNA. Gli ampliconi sono stati sequenziati tramite Illumina MiSeq. La diversità alfa basata sulle metriche Chao 1, Specie osservate, Simpson e Shannon è stata calcolata. La diversità beta tra i campioni è stata valutata utilizzando l'indice di Bray-Curtis.

Studio 3: *L. plantarum* e *L. reuteri*

L. reuteri e *L. plantarum* sono stati valutati per la sopravvivenza all'acidità gastrica. Entrambi i ceppi batterici sono stati incubati a diversi livelli di pH (2, 3, 4, 5, 7 e il controllo, ovvero il terreno di coltura in cui il pH non era stato modificato). La sopravvivenza dei ceppi alle condizioni del tratto gastrointestinale (GIT) simulate *in vitro* e valutate in accordo con Jensen et al. (2012), con leggere modifiche. La sopravvivenza è stata misurata contando il numero di unità formanti colonia con semina su terreno MRS utilizzando il metodo dell'inclusione (Warke et al., 2000). Lo studio *in vivo* è stato condotto nel rispetto delle normative italiane sull'a sperimentazione animale (d.lgs. 26/2014) in conformità con la normativa europea (Dir. UE 63/2010) ed è stato approvato dall'OPBA dell'Università degli Studi di Milano (autorizzazione n. 09_2020). Trecentocinquanta suinetti svezzati (Landrace × Large White), bilanciati in termini di peso e sesso, sono stati assegnati casualmente a quattro gruppi sperimentali (25 box, 14 suinetti/box). I suinetti sono stati alimentati con una dieta base per il gruppo controllo (CTRL, 6 box) e la dieta base integrata con 2×10^8 UFC/g di *L. plantarum* (PLA, 6 box), 2×10^8 UFC/g di *L. reuteri* (REU, 6 box) e la combinazione di entrambi i ceppi batterici (1×10^8 UFC/g di *L. plantarum* combinato con 1×10^8 UFC/g di *L. reuteri*, P+R, 7 box) per 28 giorni. L'incidenza della diarrea è stata registrata settimanalmente valutando la consistenza delle feci, alla quale è stata assegnata un punteggio di fecal score come precedentemente descritto.

RISULTATI

Studio 1

Il gruppo HAG ha mostrato un peso corporeo più elevato al giorno 40 e un incremento ponderale medio giornaliero (IPG) superiore dal giorno 14 al giorno 40 rispetto al CTRL ($p < 0{,}001$). I risultati dei parametri metabolici sierici hanno mostrato che il gruppo HAG aveva livelli più elevati di proteine totali, albumina, rapporto A/G, colesterolo, calcio, fosforo, magnesio, HDL, creatinina e trigliceridi totali a fine prova rispetto al CTRL ($p < 0{,}05$).

Studio 2

Abbiamo osservato una maggiore incidenza di diarrea nel gruppo CTRL (20 casi; 16,67% delle feci valutate) rispetto al gruppo MIX (11 casi; 9,17% delle feci valutate) durante tutto il periodo sperimentale ($p < 0{,}01$). Per quanto concerne il microbiota, non sono state osservate differenze significative nella ricchezza delle specie microbiche tra i gruppi.

A livello di genere, è stato rilevato un incremento significativo di *Prevotella* nel gruppo MIX, mentre è stata ridotta l'abbondanza relativa di *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Desulfovibrio* e *Chlamydia* rispetto al CTRL ($p < 0{,}01$).

Studio 3

I probiotici esposti a diversi intervalli di pH hanno mostrato una diminuzione significativa della sopravvivenza a pH 2. *L. plantarum* e *L. reuteri* dove hanno registrato valori di 8.09 ± 0.11 e 9.00 ± 0.02 $\log_{10}$ UFC/mL, rispettivamente ($p < 0.0001$), se confrontati ai rispettivi controlli a pH 7 (9.60 ± 0.08 e 10.79 ± 0.02 $\log_{10}$ UFC/mL, rispettivamente). Per quanto riguarda la digestione gastrointestinale simulata *in vitro*, entrambi i ceppi batterici hanno mostrato la capacità di sopravvivere in maniera efficiente a tutte le condizioni testate, compresi gli enzimi gastrici, lo shock biliare e pancreatica, senza registrare una diminuzione significativa della vitalità. Considerando l'intero periodo di prova *in vivo*, le frequenze di diarrea osservate differivano significativamente tra i gruppi ($p < 0.01$). Il numero più elevato di casi di diarrea (20 casi) è stato riscontrato nel gruppo CTRL, mentre sono stati registrati 13 e 10 casi nei gruppi REU e P+R, rispettivamente. Il numero più basso di casi di diarrea (5 casi) è stato registrato nel gruppo PLA ($p < 0.01$).

DISCUSSIONE

Studio 1

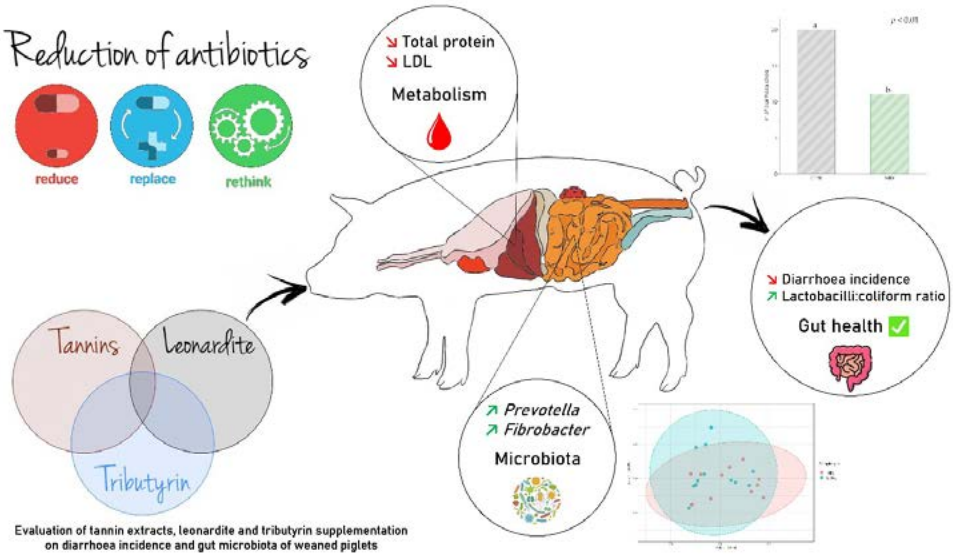
In linea con il miglioramento delle performance, Wang et al. (2008) hanno evidenziato un aumento di IPG con l'inclusione di sostanze umiche al 5% e 10% nella dieta dei suini. Trckova et al. (2018) hanno anche dimostrato l'effetto positivo della leonardite (livelli di integrazione di 20 g/kg nella dieta) sui parametri peso, consumo di alimento e IPG dei suinetti svezzati. Sebbene non sia ancora esattamente chiaro come la leonardite eserciti la sua azione, i miglioramenti nelle performance zootecniche sembrano essere correlati alla capacità delle sostanze umiche di supportare il trasporto ionico attraverso le membrane, una protezione della mucosa intestinale, l'incremento delle attività enzimatiche e una migliore digestione e adsorbimento dei nutrienti (in particolare proteine e minerali) (Trckova et al., 2018). Bai et al. (2013) hanno stimato che il livello ottimale per aumentare le performance zootecniche fosse l'integrazione dello 0,25% di acido fulvico. Pertanto, una bassa concentrazione di inclusione di HAs potrebbe migliorare la crescita dei suinetti senza influenzare la composizione dei nutrienti. I nostri risultati hanno confermato l'aumento del peso corporeo con l'inclusione della leonardite dello 0,25%, dimostrando che un livello di inclusione inferiore a quanto testato precedentemente potrebbe ugualmente migliorare le performance zootecniche, ottimizzando così anche l'uso della leonardite come additivo per mangimi.

Tutti i valori sierici rilevati erano nell'intervallo fisiologico, confermando che la leonardite non ha influenzato negativamente lo stato di salute degli animali e dovrebbe essere considerata come un additivo sicuro. Un aumento del contenuto di albumina e proteine totali potrebbe essere dovuto all'età dei suinetti e alla loro rapida crescita mostrata durante la prova (de Meer et al., 2000). L'aumento del rapporto A/G è stato una conseguenza del tenore più elevato di albumina; tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza significativa per il contenuto di globulina, il cui aumento potrebbe essere correlato a un processo infiammatorio (Bertoni et al., 2008). La maggiore quantità di magnesio sierico ($p < 0,05$) nel gruppo HAG suggerisce una risposta potenziata agli stress. Il Mg svolge un ruolo cruciale come cofattore enzimatico. Quando l'animale è sottoposto a livelli elevati di stress, vengono rilasciate catecolamine e ormoni associati allo stress che portano a uno spostamento del Mg dallo spazio intracellulare a quello extracellulare. Questo meccanismo aumenta l'escrezione urinaria di magnesio e la conseguente diminuzione delle concentrazioni di Mg sierico. Pertanto, basse concentrazioni di Mg sierico aumentano il rilascio di ormoni correlati allo stress, stabilendo così un meccanismo di regolazione a feedback (Pouteau et al., 2018). Trckova et al. (2018) hanno osservato un aumento delle quantità di Mg, Ca e P sierici nei suinetti svezzati dopo l'integrazione della dieta con leonardite (20 g/kg di alimento), confermando così i nostri risultati e suggerendo che le sostanze umiche potrebbero influenzare il contenuto minerale del siero. Anche se il profilo degli acidi grassi della dieta sperimentale non è stato influenzato dall'inclusione della leonardite, il gruppo HAG ha mostrato una concentrazione aumentata di colesterolo totale e livelli ridotti di trigliceridi rispetto al gruppo CTRL. L'aumento dei livelli di colesterolo potrebbe essere correlato a un aumento di HDL senza alcuna variazione nel livello di LDL. L'aumento di HDL potrebbe essere correlato a una maggiore concentrazione di Mg, la cui presenza o assenza è strettamente correlata all'incidenza di malattie cardiovascolari e metaboliche (Verma e Garg, 2017). Questi risultati potrebbero anche essere dovuti alla presenza di composti fenolici nella leonardite che sono riconosciuti dall'EFSA come importanti nutrienti nella protezione dei lipidi ematici dai danni ossidativi e nel mantenimento delle concentrazioni normali di HDL senza influenzare la concentrazione di LDL (EFSA, 2012). HDL protegge i vasi sanguigni diminuendo i livelli di colesterolo nel flusso sanguigno e garantendone la stabilizzazione (Grela e Klebaniuk, 2007). Questi

risultati suggeriscono che la leonardite abbia un effetto positivo sul metabolismo lipidico, oltre a proteggere i vasi sanguigni. L'inclusione di leonardite nella dieta allo 0,25% ha mostrato un effetto positivo sul profilo lipidico sierico e sulla crescita degli animali. Ciò suggerisce che la leonardite possa essere considerata come un innovativo additivo per mangimi, che migliora la salute e le performance dei suinetti svezzati.
Per l'articolo completo: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114519

Studio 2
Sebbene non sia possibile distinguere gli effetti individuali di ciascun componente funzionale integrato, la loro combinazione ha ridotto l'incidenza di diarrea grazie ai loro diversi meccanismi d'azione. Infatti, i tannini di castagno e quebracho sono sostanze antimicrobiche e antiossidanti con un potente effetto su *Escherichia coli* enterotossigeni, che sono i principali patogeni coinvolti nell'insorgenza della diarrea nei suinetti svezzati (Girard e Bee, 2020). I tannini possono influenzare direttamente la crescita batterica, compromettendo l'integrità della parete cellulare e supportando indirettamente lo stato antiossidante degli animali (Wang et al., 2009). Inoltre, l'inclusione della leonardite nel mangime, caratterizzata da una grande quantità di sostanze umiche, probabilmente stabilizza la popolazione microbica intestinale, migliorando la salute della barriera intestinale e prevenendo la diarrea. Anche se l'effetto della leonardite non è ancora completamente compreso, potrebbe essere dovuto all'affinità delle sostanze umiche alle membrane biologiche e alla loro partecipazione al trasporto ionico, che potrebbe migliorare lo stato di salute (Trckova et al., 2018). La tributirrina riduce anche la diarrea grazie all'assorbimento di nutrienti e miglioramento della morfologia dei villi intestinali nei suinetti svezzati (Dong et al., 2016). La tributirrina e l'acido butirrico abbassano il pH del tratto gastrointestinale, promuovendo un aumento di batteri benefici (Zhang et al., 2020). La diminuzione dell'incidenza della diarrea e l'effetto positivo sulla consistenza fecale potrebbero essere legati all'integrazione del mix di composti funzionali. Questi risultati sono in linea con dati precedenti che mostrano una riduzione della diarrea correlata all'inclusione di estratti di tannino, leonardite e tributirina nei mangimi per animali, proposti come valida alternativa agli antibiotici per i suinetti svezzati.
I dati del microbiota non hanno evidenziato raggruppamenti separati per l'indice di diversità beta. Inoltre, l'integrazione del MIX non ha avuto un'influenza significativa sulla diversità alfa batterica fecale. Come suggerito da Amat et al. (2020), sono necessarie ulteriori dati per chiarire il ruolo di specie di *Prevotella* sulla crescita dei suini. All'interno di questa famiglia, *Prevotella copri* è la specie più abbondante che abita il microbiota intestinale del suino dopo lo svezzamento. Questa specie è presente durante il periodo di allattamento, aumenta allo svezzamento, rimane molto abbondante nelle fasi di crescita e diminuisce nella fase di finissaggio (Wang et al., 2019). L'integrazione degli estratti di tannino di quebracho e castagno, della leonardite e della tributirrina sembrava principalmente aumentare il genere *Prevotella*, che sembra modulare altri microrganismi. Anche se il ruolo di *Prevotella* non è ancora completamente definito, nel nostro studio la sua presenza è stata correlata positivamente all'ADFI e non alla diarrea. Ulteriori studi sono necessari per chiarire gli effetti sul microbiota intestinale di questo genere microbico.
L'integrazione di estratti di tannino di quebracho e castagno, leonardite e tributirrina potrebbe essere una alternativa promettente per un uso prudente degli antimicrobici nei suinetti svezzati, che è considerato una priorità globale per la sostenibilità del settore. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per approfondire il meccanismo d'azione esatto e la concentrazione ottimale di questi tre composti funzionali per massimizzarne l'effetto sulla salute e performance degli animali.

GRAPHICAL ABSTRACT:



Per l'articolo completo: https://doi.org/10.3390/ani11061693

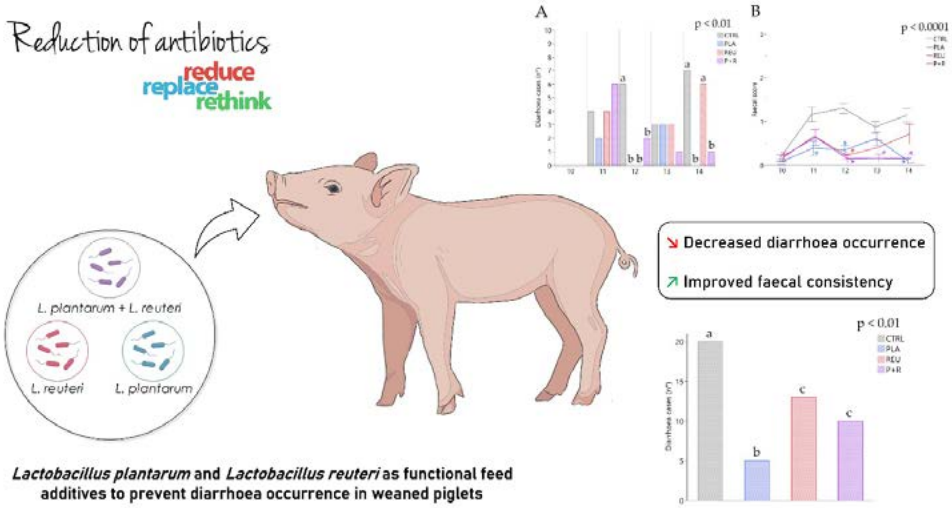
Studio 3

I risultati relativi alla tolleranza all'acido hanno mostrato che sia *L. plantarum* che *L. reuteri* tollerano livelli di pH superiori a 2 senza ridurre la sopravvivenza. In linea con il nostro studio, Yun et al. (2009) hanno dimostrato che *L. plantarum* e *L. reuteri* erano in grado di resistere a livelli di pH da 4 a 9, mentre a pH 2, entrambi i ceppi hanno mostrato una riduzione della sopravvivenza simile (20%) dopo 6 ore di incubazione. Lukacova et al. (2006) hanno riportato che più del 90% dei ceppi di *L. plantarum* deve sopravvivere a pH 3 per agire come probiotici. La tolleranza al transito nel tratto gastrointestinale simulato *in vitro* è un test importante per valutare le proprietà dei probiotici. I ceppi di *L. plantarum* e *L. reuteri* hanno mostrato un'efficiente capacità di sopravvivenza a tutte le condizioni testate. Infatti, *L. plantarum* e *L. reuteri* tollerano l'ambiente gastrico e duodenale a seconda del ceppo (Jensen et al., 2012). Bove et al. (2013) hanno valutato l'abilità di sopravvivenza di *L. plantarum* WCFS1 in un modello di tratto orogastrico-intestinale, evidenziando che questo particolare ceppo sopravvive all'intero processo digestivo. I nostri risultati suggeriscono che i ceppi di *L. plantarum* e *L. reuteri* potrebbero essere forniti tramite il mangime al fine di raggiungere l'ambiente intestinale senza una significativa perdita di vitalità, anche senza la necessità di ulteriori forme di protezione (ad esempio, microincapsulazione).

I nostri risultati hanno rivelato una minore incidenza della diarrea nei gruppi integrati con i lattobacilli. L'effetto positivo sulla diarrea è stato osservato somministrando singolarmente ceppi di *L. plantarum* o *L. reuteri* nei suinetti. Gli effetti preventivi di *L. plantarum* nei confronti di *E. coli* K88 sono stati osservati *in vitro* e *in vivo* nel suino attraverso l'aumento dell'espressione di claudina-1, zonula occludens (ZO-1) e occludina, prevenendo la disfunzione della barriera epiteliale (Wu et al., 2016). I nostri risultati sono in linea con altri studi in cui *L. reuteri* ha ridotto l'incidenza della diarrea nei suinetti. Infatti, *L. reuteri* integrato a $2{,}4 \times 10^5$ UFC/g come mix di diversi lattobacilli ha ridotto l'incidenza della

diarrea di oltre il 60% (Huang et al., 2004). L'integrazione di 2×10^8 UFC/g di *L. plantarum* e *L. reuteri* ha ridotto significativamente l'incidenza della diarrea e ha registrato il punteggio fecale più basso nel nostro studio.
Riteniamo che *L. plantarum* e *L. reuteri* siano additivi funzionali promettenti per la prevenzione della diarrea nei suinetti. Saranno necessari ulteriori studi per arricchire la conoscenza di questi ceppi batterici, valutare il loro effetto per periodi sperimentali più lunghi e ottimizzare i possibili sistemi di somministrazione.

GRAPHICAL ABSTRACT:



Per l'articolo completo: https://doi.org/10.3390/ani11061766

CONCLUSIONI
In conclusione, i composti testati non possono sostituire il trattamento terapeutico con antibiotici. Tuttavia, l'impiego di additivi funzionali può contribuire significativamente a ridurre l'insorgenza di patologie, migliorando la salute e le performance degli animali, di conseguenza, riducendo la necessità di trattamenti con antibiotici. Inoltre, è importante considerare la possibilità di combinare composti diversi, caratterizzati da differenti meccanismi d'azione, poiché ciò può produrre effetti sinergici promuovendo l'eubiosi intestinale e la resilienza degli animali.
In linea con i principi della One Health, l'integrazione dei mangimi con additivi funzionali può costituire una strategia molto interessante al fine di preservare le ultime molecole terapeutiche efficaci nei confronti delle infezioni batteriche, promuovere uno sviluppo sostenibile e contribuire alla riduzione dell'utilizzo di antibiotici in zootecnia.

BIBLIOGRAFIA

1. Amat S., Lantz H., Munyaka P.M., Willing B.P. (2020) "Prevotella in Pigs: The Positive and Negative Associations with Production and Health". Microorganisms. 8, 1-22.
2. Bai H.X., Chang Q.F., Shi B.M., Shan A.S. (2013) "Effects of fulvic acid on growth performance and meat quality in growing-finishing pigs". Livest Sci. 158, 118-123.
3. Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M. (2008) "Effects of inflammatory conditions on

liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows". J Dairy Sci. 91, 3300-3310.
4. Bove P., Russo P., Capozzi, V., Gallone A., Spano G., Fiocco D. (2013) "Lactobacillus plantarum passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis". Microbiol Res. 168, 351-359.
5. Caprarulo V., Hejna M., Giromini C., Liu Y., Dell'Anno M., Sotira S., Reggi S., Sgoifo-Rossi C.A., Callegari M.L., Rossi L. (2020) "Evaluation of Dietary Administration of Chestnut and Quebracho Tannins on Growth, Serum Metabolites and Fecal Parameters of Weaned Piglets". Animals. 10, 1-15.
6. de Meer K., Smolders H.C., Meesterburrie J., de Sain-van der Velden M., Voorbij H.A., Okken A., Reijngoud D.J., Kulik W. (2000) "A single food bolus stimulates albumin synthesis in growing piglets". J Pediatr Gastroenterol Nutr. 31, 251-257.
7. Dell'Anno M., Hejna M., Sotira S., Caprarulo V., Reggi S., Pilu R., Miragoli F., Callegari M.L., Panseri S., Rossi L. (2020) "Evaluation of leonardite as a feed additive on lipid metabolism and growth of weaned piglets". Anim Feed Sci Technol. 266, 1-12.
8. Dong L., Zhong X., He J., Zhang L., Bai K., Xu W., Wang T., Huang, X. (2016) "Supplementation of tributyrin improves the growth and intestinal digestive and barrier functions in intrauterine growth-restricted piglets". Clin Nutr. 35, 399-407.
9. EFSA Panel on Dietetic Products (2012) Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to polyphenols in olive and maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639, further assessment) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 10.
10. Girard M., Bee G. (2020) "Invited review: Tannins as a potential alternative to antibiotics to prevent coliform diarrhea in weaned pigs". Animal. 14, 95-107.
11. Grela E.R., Klebaniuk R. (2007) "Chemical composition of garlic preparation and its utilization in piglet diets". Medycyna Weterynaryjna. 63, 792-795.
12. Huang C., Qiao S., Li, D., Piao X., Ren J. (2004) "Effects of Lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs". Asian-Australas J Anim Sci. 17, 401-409.
13. Islam K.M.S., Schuhmacher A., Gropp J.M. (2005) Humic Acid Substances in Animal Agriculture. Pak J Nutr. 4, 126-134.
14. Jensen H., Grimmer S., Naterstad K., Axelsson L. (2012) "In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria". Int J Food Microbiol. 153, 216-222.
15. Lukacova D., Karovicova J., Greifova M., Greif G., Sovcikova A., Kohajdova Z. (2006) "In vitro testing of selected probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium longum". J Food Nutr. 45, 77-83.
16. Pouteau E., Kabir-Ahmadi M., Noah L., Mazur A., Dye L., Hellhammer J., Pickering G., Dubray C. (2018) "Superiority of magnesium and vitamin B6 over magnesium alone on severe stress in healthy adults with low magnesemia: A randomized, single-blind clinical trial". Plos One. 13, 1-17.
17. Reggi S., Giromini C., Dell'Anno M., Baldi A., Rebucci R., Rossi L. (2020) "In Vitro Digestion of Chestnut and Quebracho Tannin Extracts: Antimicrobial Effect, Antioxidant Capacity and Cytomodulatory Activity in Swine Intestinal IPEC-J2 Cells". Animals. 10, 1-14.
18. Sotira S., Dell'Anno M., Caprarulo V., Hejna M., Pirrone F., Callegari M.L., Tucci T.V., Rossi L. (2020) "Effects of Tributyrin Supplementation on Growth Performance, Insulin, Blood Metabolites and Gut Microbiota in Weaned Piglets". Animals. 10, 1-16.
19. Trckova M., Lorencova A., Babak V., Neca J., Ciganek M. (2017) "Effects of sodium

humate and zinc oxide used in prophylaxis of post-weaning diarrhoea on the health, oxidative stress status and fatty acid profile in weaned piglets". Veterinarni Medicina. 62, 16-28.
20. Trckova M., Lorencova A., Babak V., Neca J., Ciganek M. (2018) "The effect of leonardite and lignite on the health of weaned piglets". Res Vet Sci. 119, 134-142.
21. Wang Q., Chen Y., Yoo J., Kim H., Cho J., Kim I. (2008) "Effects of supplemental humic substances on growth performance, blood characteristics and meat quality in finishing pigs". Liv Sci. 117, 270-274.
22. Wang X., Tsai T., Deng F., Wei X., Chai J., Knapp J., Apple J., Maxwell C.V., Lee J.A., Li Y. (2019) "Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria". Microbiome. 7, 1-18.
23. Wang Y., Xu Z., Bach S., McAllister T. (2009) "Sensitivity of Escherichia coli to seaweed (Ascophyllum nodosum) phlorotannins and terrestrial tannins". Asian-Australas J Anim Sci. 22, 238-245.
24. Warke R., Kamat A., Kamat M., Thomas P. (2000) "Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, India". Food Control. 11, 77-83.
25. Wu Y., Zhu C., Chen Z., Chen Z., Zhang W., Ma X., Wang L., Yang X., Jiang, Z. (2016) "Protective effects of Lactobacillus plantarum on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic Escherichia coli in intestinal porcine epithelial cells". Vet Immunol Immunopathol. 172, 55-63.
26. Yu J., Song Y., Yu B., He J., Zheng P., Mao X., Huang Z., Luo Y., Luo J., Yan H. (2020) "Tannic acid prevents post-weaning diarrhea by improving intestinal barrier integrity and function in weaned piglets". J Anim Sci Biotechnol. 11, 1-11.
27. Yun J.H., Lee K.B., Sung Y.K., Kim E.B., Lee H.G., Choi Y.J. (2009) "Isolation and characterization of potential probiotic lactobacilli from pig feces". J Basic Microbiol. 49, 220-226.
28. Zhang W.X., Zhang Y., Zhang X.W., Deng Z.X., Liu J.X., He M.L., Wang H.F. (2020) "Effects of Dietary Supplementation with Combination of Tributyrin and Essential Oil on Gut Health and Microbiota of Weaned Piglets". Animals. 10, 1-15.

PREMIO
FORMAZIONE PROFESSIONALE ITALIA 2023

VACCINO VIVO PER E. COLI F4/F18 CASO CLINICO: EFFICACIA DEL VACCINO VALUTATA IN TERMINI DI RIDUZIONE DI CONSUMO DI ANTIBIOTICI E DI STREPTOCOCCOSI

GRAPELLI FRANCESCA

Veterinaria Libera Professionista
Suivet

INTRODUZIONE

Lo svezzamento è una fase critica della vita del suinetto, a causa dei numerosi cambiamenti che deve affrontare: dieta, ambiente e gerarchia del nuovo gruppo sociale. Lo stress che ne deriva mina le difese immunitarie, determinando la comparsa, molto spesso, della diarrea da post svezzamento e la streptococcosi.

La diarrea da post svezzamento (o Post-Weaning Diarrhoea- PWD) è una sindrome polifattoriale che caratterizza le prime 3 settimane dello svezzamento ed è associata ad un minor incremento di peso corporeo e ad una mortalità che può toccare il 15%, qualora non adeguatamente trattata. Una colostratura assente o di scarsa qualità, uno svezzamento precoce, la coesistenza di altre infezioni e lo stress legato al distacco dalla madre, sono fattori che predispongono l'adesione delle fimbrie dell'*Escherichia Coli,* patotipo ETEC all'epitelio intestinale, scatenando così la PWD. Fra gli ETEC più frequentemente isolati troviamo quelli associati alle fimbrie F4 e F18: i recettori per F4 sono espressi durante tutta la vita del suino, mentre quelli per l'F18 sono espressi approssimativamente a partire dalla terza settimana di vita (*Jeffrey J. Zimmerman et all, 2019).*

La streptococcosi suina è causata da *Streptococcus suis* (sierotipo 2 e 9 sono i maggiormente diffusi), un batterio opportunista, che, una volta penetrato nell'organismo, si stabilizza nelle tonsille del suinetto, per emergere in condizioni di immunodepressione. È ormai consolidato che le principali vie d'infezione siano quella aerogena e quella da contatto; tuttavia, studi scientifici recenti hanno dimostrato come anche la via orale sia da tenere in considerazione (*Ferrando ML et al., 2015; Ferrando ML et Schultsz, 2016*). Molteplici fattori, tra cui l'omeostasi intestinale dell'ospite, i meccanismi immunitari e il tasso di crescita batterica, determinano un lento processo di traslocazione paracellulare di *S. suis* dal lume intestinale al sistema linfatico e, infine, a quello sanguigno. *Streptococcus suis* è in grado di provocare quadri anatomopatologici di polisierosite, a localizzazione focale (articolazioni, pericardio, pleure, meningi) o diffusa; nella sua localizzazione diffusa la clinica è iperacuta o acuta e l'animale muore improvvisamente per setticemia.

L'azienda suinicola presa in esame, nonostante godesse di elevata stabilità alla PRRS, mostra, in tutti i siti 2, diarrea e sintomi nervosi nell'arco di 4-6 giorni dall'accasamento, che obbligano l'operatore ad utilizzare antibiotici ora specifici per la diarrea, ora per la streptococcosi. L'azienda è composta di 2 scrofaie a banda settimanale che ogni settimana svezzano 1000-1100 lattoni, che raggiungono i 2 siti di svezzamento. Tali svezzamenti, differenti per struttura e per ambiente, non eseguono il TPTV ed ospitano fino a 2200-4000 lattoni di provenienza e di età diversi.

In questo report vengono illustrati gli effetti dell'introduzione della profilassi vaccinale orale contro Escherichia coli patogeni per i lattonzoli, la quale dovrebbe ridurre la manifestazione della diarrea da post svezzamento, indirettamente la streptococcosi e, quindi, l'utilizzo di antibiotici.

Descrizione del caso

L'azienda

L'azienda suinicola è composta da 2 scrofaie e da 2 siti di svezzamento.

Le scrofaie sono così organizzate:

- A: organizzata in banda settimanale, composta di sole scrofe Topigs pluripare con lattazione a 27 giorni e con un numero di svezzati di circa 550-600 suinetti, di peso medio 8 kg;
- B: organizzata in banda settimanale, composta di sole scrofe Topigs primipare con lattazione a 27 giorni e con un numero di svezzati di circa 400-450 suinetti, di peso medio 7,5-8 kg;

Tutte le scrofaie lasciano in gabbia parto una ciotola con acqua e sali reidratanti per i primi 3-4 gg di vita, i quali vengono sostituiti con mangime prestarter; fin dal primo giorno di vita è disponibile il latte artificiale con distribuzione automatica.

Le scrofe sono vaccinate con il vaccino stabulogeno per Streptococcus suis 2 e 9; la vaccinazione sulle scrofe per l' E. coli non è presente dal momento che in lattazione si riscontrano rari episodi di diarrea. Non si effettua induzione del parto.

I 2 siti di svezzamento sono così organizzati:

- C: ospita fino a 2200 lattoni (ossia 2 bande diverse di svezzati), distribuiti in 4 settori, con box da 36. Presenta ventilazione forzata, pavimentazione in grigliato di plastica, tettoie in plastica per coprire il nido (grigliato anch'esso), mangiatoie tipo mangia-bevi (in ogni box sono presenti 3 abbeveratoi, 2 della mangiatoia e 1 a tazza);
- D: ospita fino a 4000 animali (ossia 4 bande diverse di svezzati), distribuiti in 2 settori, con box da 65. La pavimentazione è in grigliato di plastica e la ventilazione è forzata. Sono presenti tettoie di plastica per coprire il nido, grigliato anch'esso, ma al di sotto del quale, sono stati inseriti dei teloni di plastica per attenuare le correnti d'aria che nell'ampia vasca di raccolta liquami si vengono a creare. È presente una mangiatoia con il mangime a secco e 3 abbeveratoi a beccuccio.

Tutti gli operatori dei siti di svezzamento sono soliti creare gruppi di lattoni omogenei per taglia, pur mantenendoli separati per scrofaia d'origine. È abitudine inserire una ciotola aggiuntiva nei boxes dei più piccoli con acqua e/o mangime ed eventualmente sali reidratanti. Nonostante questi accorgimenti e l'accoglienza dell'ambiente, la diarrea e i sintomi nervosi si manifestano immediatamente, rendendo necessari vari trattamenti di massa con antimicrobici.

Possibile soluzione al problema: vaccinazione orale con il vaccino vivo apatogeno del mercato, contenente gli antigeni per F4 ed F18, studiato per fornire l'immunizzazione attiva dei suini dai 18 giorni di età nei confronti di E. coli F4-positivo e F18-positivo enterotossigeno, che si propone di:

- ridurre l'incidenza di diarrea post-svezzamento da moderata a grave causata da E. coli nei suini infetti e ridurre l'escrezione fecale di E. coli F4-positivo e F18-positivo enterotossigeno dai suini infetti;
- determinare un incremento di peso dei suinetti alla fine dello svezzamento (almeno + 700 g)
- ridurre la comparsa, indirettamente, di streptococcosi;
- ridurre l'uso precoce di antibiotici nel primo svezzamento.

Da foglietto illustrativo, l'insorgenza dell'immunità si manifesta 7 giorni dopo la vaccinazione, poiché stimola localmente il GALT e ha durata di 21 giorni. Essendo un vaccino vivo, i ceppi vaccinali possono essere escreti dai suinetti vaccinati per almeno 14 giorni successivi la vaccinazione, onde per cui, i ceppi vaccinali, si diffondono facilmente anche agli altri suini non vaccinati o che non hanno assunto un quantitativo sufficiente di vaccino. La vaccinazione è stata effettuata nei siti 1: lo svezzamento fissato al mercoledì ha obbligato la vaccinazione a circa 21 giorni di età, con suinetti di 18 e altri di 24 giorni. L'azienda si è affidata al personale tecnico della ditta produttrice per testare il vaccino sui propri maiali: si è deciso di somministrare il vaccino orale attraverso l'assunzione in ciotola. I suini bevono il vaccino che è stato introdotto

nella ciotola con acqua prestabilizzata, con un prodotto che neutralizza eventuali effetti negativi di cloro e/o metalli pesanti presenti e conferisce al liquido una colorazione blu che consente di tracciare una corretta assunzione del vaccino da parte dei suinetti.
Dal momento che ogni sito 2 raggiunge la capienza massima in 2-4 arrivi di lattoni, cadenzati in 2-4 settimane, si è deciso di riempire una parte dello stesso con animali vaccinati e l'altra con animali non vaccinati.

RISULTATI

C				
arrivo 11/10				
kg medi in	kg medi out	gg presenza	IMG	mortalità%
9,38	39,89	58	0,526034	1,3
arrivo 18/10				
kg medi in	kg medi out	gg presenza	IMG	mortalità %
8,23	41,27	62	0,532903	1,1

Figura 1 IMG-incremento medio giornaliero (kg)

Sito C
- Arrivo dell'11/10: lattoni non vaccinati.
- Arrivo 18/10: lattoni vaccinati. Dopo 6 giorni dallo svezzamento, in qualche boxes compare diarrea e si procede con il trattamento di massa a base di lincomicina e spectinomicina; si riporta che in 48 ore i lattoni mostrano un miglioramento della clinica, a differenza di quanto accade solitamente per quelli non vaccinati. Qualche animale è stato trattato per la streptococcosi. Sono seguiti trattamenti di massa con amoxicillina per *Streptococcus suis*, a distanza di 4-5 gg fino alla fine del ciclo.

L'arrivo del lotto di suini vaccinati ha mostrato un incremento medio giornaliero maggiore e un tasso di mortalità minore.

D				
arrivo 20/9				
kg medi in	kg medi out	gg presenza	IMG	mortalità%
7,63	33,99	51	0,516863	1,2
arrivo 27/9				
kg medi in	kg medi out	gg presenza	IMG	mortalità%
7,86	27,6	45	0,438667	0,8
arrivo 31/10				
kg medi in	kg medi out	gg presenza	IMG	mortalità%
8,91	36,05	52	0,521923	1,1
arrivo 8/11				
kg medi in	kg medi out	gg presenza	IMG	mortalità%
8,86	37,92	51	0,569804	1,2

Figura 2 IMG-incremento medio giornaliero (kg)

Sito D

- Arrivo del 20/9 e del 27/9: lattoni non vaccinati.
- Arrivo 31/10: lattoni vaccinati. All'arrivo si mostravano lievemente abbattuti, poco reattivi, i più piccoli con qualche sintomo enterico; si è sospettato che la temperatura ambientale fosse troppo bassa, visto anche le ampie dimensioni del capannone, per cui si è proceduto all'aumento della temperatura e alla somministrazione di antinfiammatorio in dosatron. Dopo 9 giorni dall'arrivo, è stato somministrato, non per necessità ma per comunicazione di tubature, l'amoxicillina e l'acido clavulanico.
- Arrivo 8/11: lattoni vaccinati. Si tratta dei lattoni di cui sopra detto (*). Il giorno seguente lo svezzamento hanno mostrato diarrea; è stato, quindi, iniziato il trattamento di massa con l'amoxicillina e l'acido clavulanico.

Sono seguiti trattamenti di massa con amoxicicllina per *Streptococcus suis*, a distanza di 4-5 gg fino alla fine del ciclo, per tutti e due gli arrivi. Anche in questo caso, l'operatore riporta che, una volta iniziato il trattamento antimicrobico, gli animali nell'arco di 48-72 ore hanno reagito e la clinica è scomparsa.

L'incremento medio giornaliero è stato maggiore nei soggetti vaccinati mentre la mortalità non ha subito significative alterazioni (se paragonata ai giorni di permanenza in svezzamento).

DISCUSSIONE

Dai risultati è emerso che negli svezzamenti è comparsa una lieve-moderata diarrea in qualche boxes e anche la streptococcosi, quasi al pari dei cicli precedenti non vaccinati. Emergono tuttavia una serie di osservazioni che è opportuno citare:

- gli operatori dello svezzamento hanno entrambi riportato un'efficace risposta agli antibiotici, più rapida di quanto accada con soggetti non vaccinati;
- per gli arrivi del 18/10 e del 31/10 l'inizio del trattamento di massa con antimicrobico è stato posticipato di 3-4 giorni;
- nel sito D, l'arrivo del 8/11 ha presentato alcuni episodi di diarrea già dal giorno dello svezzamento. È stato riportato che durante le operazioni di vaccinazione della suddetta svezzata una parte del vaccino sia stato bevuto dalle scrofe, a causa delle dimensioni della gabbia parto, la quale ha obbligato a posizionare la ciotola adiacente la scrofa. Inoltre il sito in questione è composto da boxes ad alta densità, per cui aumenta il peso dei fattori predisponenti la PWD;
- il sito C è localizzato a 25 km dalle scrofaie, rispetto ai 10 km circa dell'altro svezzamento ed è composto da boxes a moderata densità (36), per cui anche in questo caso lo stress per i lattoni può essere maggiore e giustificare la comparsa della diarrea post svezzamento;
- l'età dei lattonzoli al momento della vaccinazione non era la medesima, dal momento che non si effettua l'induzione dei parti: sono stati vaccinati quando la media dell'età era di 21 giorni, con animali di 18 e altri di 24 giorni. Nonostante la bibliografia attesti che i recettori di F18 compaiano a partire dalla terza settimana di vita, allungando la lattazione e il timing della vaccinazione, aumenta la probabilità di avere una protezione immunitaria attiva più omogenea. Inoltre, un animale più grande ha capacità ingestive e vitalità maggiori per cui, in poco tempo, esaurisce tutto il contenuto della ciotola e tutti i recettori di F18 sviluppatesi, in unico momento, vengono colonizzati dal vaccino vivo. A tal proposito, merita di essere menzionato un fatto che dimostra proprio quanto appena ipotizzato, nonostante si faccia riferimento ad una terza scrofaia dell'azienda che è stata tralasciata in questo studio poichè applica una lattazione a 28-35 giorni, svezzando lattoni di 9-10 kg di peso non confrontabili per capacità ingestive con i lattoni delle altre due scrofaie; comunque sia, vaccinando questi lattonzoli tra i 27-28

giorni di vita il trattamento di massa nel sito 2 con amoxicillina per la streptococcosi è stato iniziato dopo 14 giorni dall'arrivo, quando di solito, viene iniziato dopo 3-4 giorni ed, inoltre, non è stata osservata diarrea.

Per confermare i risultati sopra menzionati, sarebbe interessante ripetere la prova con la ciotola aumentando però l'età alla vaccinazione in quanto animali più pesanti assumono con ancora maggior facilità il vaccino. La ciotola è un metodo molto pratico e permette di ottimizzare i tempi per gli operatori della sala parto e ridurre lo stress per i suinetti. Anche provare l'utilizzo del drencher potrebbe essere interessante dal momento che garantisce la dose corretta di vaccino a ciascun animale, sebbene richieda un'attenzione maggiore da parte degli operatori ad attendere la deglutizione del lattonzolo prima di riporlo a terra. Molto significativo sarebbe ripetere la prova accasando nei siti 2 solo soggetti vaccinati per qualche ciclo, verificare gli effetti della colonizzazione ambientale e poi confrontarne i dati con i cicli precedenti perché, per le caratteristiche intrinseche del vaccino e con il fine di esprimerne al massimo il potenziale, lo si dovrebbe somministrare a più bande consecutive di suinetti in sala parto, per permettere al Coli apatogeno vaccinale di colonizzare l'ambiente e sostituirsi all'*Escherichia coli* patogeno presente.

BIBLIOGRAFIA

1. *EMA (Agenzia Europea per i Medicinali), "©Coliprotec F4/F18 liofilizzato per sospensione orale per suini", http://www.ema.europa.eu/ , 09/01/2017.chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180709141587/anx_141587_it.pdf*
2. *Ferrando ML, de Greeff A, van Rooijen WJ, Stockhofe-Zurwieden N, Nielsen J, Wichgers Schreur PJ, Pannekoek Y, Heuvelink A, van der Ende A, Smith H, Schultsz C.(2015) "Host-pathogen Interaction at the Intestinal Mucosa Correlates With Zoonotic Potential of Streptococcus suis". J Infect Dis., 212(1):95-105*
3. *Ferrando ML, Schultsz C. (2016) "A hypothetical model of host-pathogen interaction of Streptococcus suis in the gastro-intestinal tract". Gut Microbes ,7(2):154-62*
4. *Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz, Gregory W. Stevenson, Jianqiang Zhang (2019) "Diseases of Swine", 11a ed., Hoboken (NJ, USA), John Wiley & Sons*

PREMIO
FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2023

BENESSERE DELLA SCROFA O SICUREZZA DEL SUINETTO? COME LA PLF PUÒ AIUTARE A RISOLVERE IL DILEMMA

SOW CONFINEMENT OR PIGLET SAFETY? A PLF SOLUTION FOR THE WELFARE DILEMMA

MENEGON F.[1], GAN H.[2,3], LEONE L.[4], PUGGIONI A.[4], GALLI M.C.[4], PERRUCCI A.[4], DI MARTINO G.[1], NORTON T.[3*], SCOLLO A.[4*]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Italy;*
[2] *College of Electronic Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China;*
[3] *Faculty of Bioscience Engineering, Katholieke Universiteit Leuven (KU LEUVEN), Kasteelpark Arenberg 30, 3001 Heverlee/ Leuven, Belgium;*
[4] *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università of Torino, Grugliasco, 10095 Torino, Italy*

*****Corresponding Authors: Tomas Norton (tomas.norton@kuleuven.be), Annalisa Scollo (annalisa.scollo@unito.it)

Parole chiave: schiacciamento, etogramma, PLF
Keywords: crushing events, ethogram, PLF

Riassunto
Lo schiacciamento in sala parto rappresenta la prima causa di mortalità pre-svezzamento con significative perdite economiche. Per ridurre il rischio di schiacciamento, le scrofe sono allevate in gabbie e sottoposte a limitazioni fisiche ed etologiche. Il Parlamento Europeo richiama il mondo produttivo ad adoperarsi per la fine dell'allevamento in gabbia entro il 2027, aumentando il rischio di schiacciamento. Prevedere e prevenire gli eventi di schiacciamento è molto difficile a causa della loro natura multifattoriale. Per affrontare questo problema, viene proposto un metodo automatico per analizzare gli eventi di schiacciamento dei suinetti, utilizzando un dataset di 104 video in box parto con gabbia aperta. Il modello è stato addestrato da 836 immagini in cui i suinetti non erano occlusi e testato con 412 immagini di schiacciamento. Il metodo proposto ha raggiunto risultati di segmentazione di IoU di 0.930, 0.911, 0.888, 0.853 e 0.834, rispettivamente su cinque livelli di occlusione, ottenendo risultati migliori rispetto ai metodi ad oggi disponibili. Per studiare i fattori di rischio legati allo schiacciamento è stato creato un etogramma per scrofa, suinetto schiacciato e nidiata. Due operatori hanno analizzato 28 video usando il software BORIS ottenendo un coefficiente di Cohen di 0,931, dimostrando la correttezza d'utilizzo e l'appropriatezza dell'etogramma. I dati di analisi dei video aiuteranno il computer a trarre informazioni da ciò che vede, permettendo una valutazione automatica dei fattori di rischio.

Abstract
Piglet crushing accounts for the great majority of live-born pre-weaning losses, with significant economic implications. In conventional farms, the risk is mitigated by confining sows in farrowing crates that restrict their movements, raising welfare concerns. The European Parliament calls for phasing out cages in animal farming by 2027, including sows' farrowing crates, but this poses an increased risk of piglet crushing. Predicting and preventing crushing events is challenging due to their multifactorial nature (genetics, environment, health status, pen

design). To address this, an automatic method for analyzing piglet crushing events is proposed, utilizing a dataset of 104 video clips in open creates farrowing pens. The training dataset consisted of 836 images where piglets were not occluded and the test dataset consisted of 412 images where crushing events occurred. The proposed method achieved segmentation results with an IoU of 0.930, 0.911, 0.888, 0.853, and 0.834 on five occlusion levels, respectively, outperforming other state-of-the-art methods. An ethogram for sows, crushed piglets, and litters is proposed to study the risk factors of crushing events. Two operators analyzed 28 videos using BORIS software, reaching a Cohen's coefficient of 0.931, demonstrating the correctness of the ethogram's usage and its suitability. The video analysis data will assist the computer in extracting information from what it sees. When fully implemented, this method will accurately detect crushing events to identify the predicting patterns and promptly intervene.

INTRODUZIONE

Lo schiacciamento in sala parto rappresenta la prima causa di mortalità pre-svezzamento dei suinetti, causando il 55% delle morti durante il periodo di lattazione (Liu et al., 2022), con conseguenti perdite economiche considerevoli per le aziende. Le morti per schiacciamento generalmente si verificano quando la scrofa cambia posizione, specialmente quando si sdraia o si volta lateralmente. Sebbene sia normale che prima del parto le scrofe manifestino irrequietezza, questa in alcuni soggetti può protrarsi anche dopo il parto, portandole a cambiare posizione più frequentemente (Damm, Vestergaard, Schrøder-Petersen, & Ladewig, 2000). Le ragioni non sono chiare, ma potrebbero essere riconducibili alla frustrazione per mancato espletamento del comportamento materno o per la limitazione di spazio o per mancanza di materiale di nidificazione (Thodberg, Jensen, Herskin, & Jørgensen, 1999). Anche l'attenzione che le scrofe dedicano al cambiamento di posizione potrebbe influenzare la probabilità di schiacciamento, specialmente nel caso dei suinetti più deboli che sono meno vigili e reattivi (Burri, Wechsler, Gygax, & Weber, 2009).

Per minimizzare il rischio di schiacciamento, le scrofe in lattazione sono sottoposte a limitazioni fisiche ed etologiche attraverso la presenza di sbarre, che riducono la loro libertà di movimento (Baxter, Lawrence, & Edwards, 2012; Panel, 2008). Le gabbie parto convenzionali permettono alla scrofa solamente di alzarsi e fare un passo avanti o indietro. La scrofa non può girarsi o assumere altre posture. Si tratta di una condizione di discomfort protratta per tutta la lattazione (EFSA, 2022).

Considerando l'assenza di restrizioni normative sul loro utilizzo, queste strutture rappresentano in UE la scelta più frequente (95% del totale di allevamenti) (Johnson & Marchant-Forde, 2009) nonostante le crescenti pressioni da parte dell'opinione pubblica per la loro abolizione, supportate da evidenze scientifiche che ne confermano la scarsa compatibilità con il benessere della scrofa (KilBride et al., 2012). Il Parlamento Europeo ha proposto la fine dell'allevamento in gabbia entro il 2027. Il voto è seguito all'iniziativa dei cittadini europei "End the Cage Age", guidata da 170 organizzazioni non governative (ONG) in tutta Europa, che ha raccolto 1,4 milioni di firme da parte dei cittadini dell'UE e ha chiesto la graduale eliminazione delle gabbie negli allevamenti (European Parliament, 2021).

Questo scenario pone delle incertezze per quanto riguarda lo schiacciamento dei suinetti, in quanto non sono disponibili protocolli specifici per gestire le strutture alternative che identificano il miglior compromesso tra le necessità etologiche materne e il rischio di schiacciamento, con una perdita di sostenibilità economica per il settore suinicolo e conseguente reticenza ad abbandonare le gabbie. Inoltre, sono molto limitati gli studi sulla connessione tra il benessere materno e la salute dei suinetti e le prestazioni produttive.

L'obiettivo di questo progetto è studiare i fattori di rischio ambientali, comportamentali, sanitari, gestionali e strutturali legati allo schiacciamento dei suinetti in box privi di gabbia parto utilizzando metodi innovativi come la *computer vision*. Lo scopo finale è sviluppare un

sistema in grado di identificare precocemente i suinetti a rischio di schiacciamento, così da poterli gestire in modo appropriato.

MATERIALI E METODI

Lo studio si svolge in una scrofaia convenzionale italiana, che utilizza box parto *welfare-friendly* in cui durante i primi giorni dal parto la scrofa viene mantenuta in gabbia parto (190x65cm), mentre tra il quinto e il settimo giorno la gabbia parto viene aperta e la scrofa è libera di muoversi nel box assieme ai suinetti (251,5x282,5 cm, al cui interno c'è il nido di 194x70 cm). Sono state installate 24 telecamere (4 megapixel, 30Fps), ognuna posizionata al di sopra di un box per dare una visione dall'alto dell'intera superficie. La registrazione avviene in modo continuo dal giorno prima del parto fino allo svezzamento. I video degli episodi di schiacciamento vengono tagliati, da pochi minuti prima dello schiacciamento, fino a un minuto dopo. Sono stati raccolti 154 video, 77 a gabbia parto chiusa e 77 a gabbia parto aperta.

Per ogni schiacciamento viene riportato l'identificativo della scrofa, la data e l'ora. Sono stati raccolti i dati riguardanti i parametri ambientali al momento dello schiacciamento (temperatura esterna, del box e del nido, NH_3, CO_2); tali parametri vengono acquisiti in azienda in modo continuativo tramite sensori presenti nel nido e nella stanza. Sono stati raccolti i dati produttivi di ogni scrofa: ordine di parto, numero di suinetti nati vivi, nati morti, mummificati, schiacciati, durata della gestazione, numero di suinetti svezzati. Per una parte di scrofe sono stati raccolti i dati relativi al grasso e al muscolo dorsale al parto e allo svezzamento. Sono stati raccolti i dati gestionali: posizione della lampada, ore dall'ultima somministrazione di cibo, giorno della castrazione e delle manipolazioni, la caudectomia non viene effettuata.

Il progetto comprende anche lo studio del comportamento, che avviene attraverso BORIS (*Behavioral Observation Research Interactive Software*) (Friard & Gamba, 2016), un software open-source che permette l'annotazione di eventi e osservazioni su file video. Sulla base dei fattori di rischio riportati in bibliografia, è stato messo a punto un etogramma (Tabella 1) per valutare il comportamento della scrofa, del suinetto coinvolto nello schiacciamento e degli altri suinetti della nidiata. Viene inoltre annotata la posizione del suinetto nel box al momento dello schiacciamento. La valutazione del comportamento è stata effettuata da due operatori; per accertare la concordanza della loro valutazione, sono stati stabiliti criteri di valutazione ed è stato calcolato il coefficiente di Cohen sulle valutazioni dei due operatori dello stesso video.

Parallelamente, è stato sviluppato un modello di *computer vision* per identificare gli schiacciamenti in modo automatico a partire da video. La *computer vision* permette al modello di ricavare informazioni significative da input visivi e intraprendere azioni o formulare delle segnalazioni sulla base di tali informazioni. Ha bisogno di molti *input* per eseguire analisi di dati più e più volte fino a quando non distingue e riconosce le immagini. In questo studio gli input sono rappresentati dai fotogrammi che sono stati estratti dai video (25 frame/sec) e selezionati affinché ogni frame fosse diverso da un altro. In ogni fotogramma è stata fatta *istant segmentation*, che consiste nel contornare le sagome di scrofa e suinetti, comprendendo anche le parti non visibili. I soggetti sono stati poi identificati assegnando ad ognuno un codice univoco. È stato utilizzato un dataset di 104 video di eventi di schiacciamenti avvenuti con gabbia parto aperta. Il dataset di addestramento consisteva in 836 immagini in cui i suinetti erano completamente visibili (non schiacciati), mentre il dataset di test consisteva in 412 immagini in cui si sono verificati eventi di schiacciamento.

RISULTATI

Ad oggi sono stati analizzati 28 video da entrambi gli operatori e 18 video da un solo operatore. I video di entrambi gli operatori hanno in media un coefficiente di Cohen di 0,931, dimostrando la correttezza d'utilizzo dell'etogramma e la sua appropriatezza. L'etogramma di scrofa, suinetto schiacciato e altri suinetti viene riportato in Tabella 1, e considera alcuni

dei possibili fattori di rischio: il tipo di movimento e il tempo impiegato dalla scrofa durante il cambio di posizione e l'eventuale utilizzo di supporti (es. pareti del box). Il cambio di posizione definisce il movimento che esita nello schiacciamento, l'utilizzo delle pareti indica se la scrofa nel cambio di posizione si appoggia a delle superfici o meno.
Per quanto riguarda il suinetto, vengono considerati lo stato di salute e il tipo di attività che svolge nel periodo antecedente allo schiacciamento. Il livello di rischio indica quanto è visibile il suinetto al momento dello schiacciamento. Tutti questi dati verranno utilizzati per l'analisi comportamentale, definiranno il *time budget* per ogni comportamento, ovvero quanto tempo viene speso per comportamenti diversi, e, infine, aiutano il computer a trarre informazioni dalle immagini analizzate.

Tabella 1. Etogramma di ogni soggetto. I comportamenti vengono divisi in categorie, e possono essere eventi che hanno una durata nel tempo (State event) oppure azioni puntuali (Point event).
Table 1. Ethogram of each subject. Behaviours are divided into categories and can be either time-duration events (State events) or point actions (Point events).

Soggetto	*Categoria*	*Comportamento*	*Evento*
Scrofa	*Cambio posizione*	Da in stazione a buttata, piegando prima gli anteriori	State event
		Da in stazione a buttata, piegando prima i posteriori	State event
		Da in piedi a seduta	State event
		Da decubito ventrale a laterale	State event
		Da decubito laterale a ventrale	State event
		Da seduta a buttata	State event
		Cammina	State event
	Utilizzo delle pareti	Usa le pareti	Point event
	Comportamento	Colpo di testa per buttarsi	Point event
		Reattività durante lo schiacciamento	Point event
		Routing behaviour	State event
		Annusa l'ambiente	State event
		Annusa un suinetto	State event
	Schiacciamento	Schiacciamento	State event
Suinetto schiacciato	*Attività*	Dorme	State event
		Mangia	State event
		Cammina	State event
		In stazione	State event
		Seduto	State event
		Buttato	State event
	Stato di salute	Sano	Point event
		Malato	Point event
	Livello di rischio	Schiacciamento di <40% del tronco	State event
		Schiacciamento di >40% del tronco	State event
		Completamente schiacciato	State event
		Schiacciato e poi liberato	Point event
Altri suinetti	*Entrata/uscita dal nido*	Entrato	Point event
		Uscito	Point event

È stato utilizzato un approccio ibrido che ha combinato tecniche di *machine learning* (apprendimento statistico) e *deep learning* (reti neurali) per individuare e classificare le "occlusioni", ovvero oggetti che nell'immagine risultano coperti da altri (Gan et al., 2024).
La seguente pipeline è stata utilizzata per la classificazione delle occlusioni:
1. Estrazione delle sagome dei suini (*Minimum Bounding Box*) usando una rete neurale convoluzionale (CNN, l'architettura tipica per il trattamento di immagini).
2. Estensione delle sagome dei suini che risultavano coperti dalla scrofa.
3. Estrazione di un "vettore di features" relative a tali sagome fornito sempre dall'impiego della CNN.
4. Predizione del posizionamento dei singoli pixel relativi ai suini coperti utilizzando il *Bayesian Lattice Classifier* (BLC): un algoritmo di apprendimento statistico che ha "imparato" la forma dei suini da una serie di 24 template che raffiguravano i suini in diverse posture e angolazioni.
5. Classificazione dei diversi tipi di occlusione (occlusione dovuta a schiacciamento o meno).
Addestrato con immagini in cui i suinetti non erano occlusi, il metodo proposto ha ottenuto risultati di segmentazione con un livello di precisione (*Intersection over Union, IoU)* di 0.930, 0.911, 0.888, 0.853 e 0.834, rispettivamente su cinque livelli di occlusione, ottenendo risultati migliori rispetto ai metodi ad oggi disponibili.

DISCUSSIONE

Studi precedenti hanno proposto delle soluzioni fisiche per migliorare il benessere della scrofa in sala parto e limitare la mortalità dei suinetti, tra queste una gabbia parto più spaziosa, la predisposizione di supporti che la scrofa può utilizzare per buttarsi più agevolmente (Damm, Forkman, & Pedersen, 2005), tappetini e pavimentazioni diverse (Danholt, Moustsen, Nielsen, & Kristensen, 2011; Gu et al., 2010). Altri studi, grazie all'utilizzo di sensori che identificano quando la scrofa si alza o si sdraia, hanno proposto una gabbia parto che si alza di 28 cm rispetto a dove stazionano i suinetti quando la scrofa si alza, e si abbassa solo nel momento in cui la scrofa si è coricata (Costa et al., 2022), o una gabbia parto in cui viene emesso un getto d'aria per allontanare i suinetti quando la scrofa si butta (Jeon et al., 2005). Tuttavia, nel settore suinicolo c'è un alto potenziale per sviluppare strumenti informatizzati per la valutazione del benessere e ed è ancora necessario molto lavoro per arrivare a una soluzione per la valutazione del benessere in azienda da remoto e in tempo reale. Sebbene siano disponibili dei software per valutare il comportamento di alcune specie animale (Grieco et al., 2021), questi non vengono ancora applicati al settore suinicolo. Riuscire a leggere il comportamento animale permetterebbe di impostare degli output in risposta per evitare lo schiacciamento.
I dati dell'analisi dei video che emergeranno da questo studio aiuteranno il computer a trarre informazioni da ciò che vede, e a imparare a valutare i video autonomamente seguendo gli stessi criteri. Ciò permetterà di valutare automaticamente i fattori di rischio nei video e di impostare un allarme una volta superata una soglia di rischio. In questo modo sarà possibile per l'operatore intervenire tempestivamente.
Lavorare con una segmentazione precisa è fondamentale per l'analisi automatizzata basata sulla visione degli schiacciamenti dei suinetti, che richiede l'estrazione continua delle informazioni sul movimento durante il riconoscimento dell'evento. Poiché questo studio si concentra principalmente sulla segmentazione dei suinetti occlusi dalle scrofe, l'occlusione tra suinetti non è stata affrontata esaustivamente. Tuttavia, introducendo la rilevazione delle parti del corpo, il metodo SBBE (*Segmentation-based bounding box extension*) può facilmente estendere il box di delimitazione nella direzione appropriata e quindi la correzione del box potrebbe essere estesa all'occlusione tra suinetti.

CONCLUSIONI

Nell'ambito di questo studio è stato definito un etogramma per analizzare il comportamento della scrofa, del suinetto e della nidiata durante eventi di schiacciamento verificatesi in box parto con gabbia aperta. La concordanza tra le valutazioni dei due operatori conferma l'appropriatezza dell'etogramma, e la praticità del suo utilizzo per studiare i fattori di rischio e possibili soluzioni per prevenire gli schiacciamenti. I risultati dell'analisi dei video tramite BORIS e dei dati ambientali, produttivi e gestionali saranno utili per identificare i principali fattori di rischio e proporre protocolli gestionali per l'allevamento della scrofa in gabbia parto aperta. Inoltre, verranno studiate le criticità legate alla struttura e ai materiali del box per proporre soluzioni migliorative. È stato impiegato un algoritmo ibrido che combina *deep learning* e *traditional machine learning* per identificare automaticamente gli eventi di schiacciamento. Il modello si è dimostrato in grado di svolgere la segmentazione automatica con un elevato livello di precisione ottenendo risultati promettenti rispetto ai metodi ad oggi disponibili. Inoltre, nonostante le reti neurali abbiano tipicamente bisogno di grandi quantità di dati per ottenere performance accettabili, in questo caso l'unione delle diverse tecniche di apprendimento ha permesso di ridurre drasticamente i dati necessari per il "training" e quindi anche il carico di lavoro per estrarre e classificare manualmente le immagini.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la SIPAS per avere consentito l'approfondimento della tematica attraverso un periodo di formazione all'estero dal 30/05/2023 al 28/05/2023 presso la Faculty of Bioscience Engineering, Katholieke Universiteit Leuven, dove sono state studiate le metodologie per l'analisi automatica dei video. Inoltre si ringraziano L'università di Torino e l'Istituto Zooprofilattico per la condivisione dei dati e degli strumenti di analisi (Progetto RC 9/22 CUP: B23C22000930001), la Struttura srl ed Evoteck per la disponibilità delle strutture e tutto il personale dell'allevamento per la collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Baxter, E. M., Lawrence, A. B., & Edwards, S. A. (2012). Alternative farrowing accommodation: Welfare and economic aspects of existing farrowing and lactation systems for pigs. Animal, 6(1), 96-117.
2. Burri, M., Wechsler, B., Gygax, L., & Weber, R. (2009). Influence of straw length, sow behaviour and room temperature on the incidence of dangerous situations for piglets in a loose farrowing system. Applied Animal Behaviour Science, 117(3-4), 181-189.
3. Costa, A., Salvagnini, C., Buoio, E., Palmeri, F., Salvagnini, A., & Mazzola, S. M. (2022). The effect of lift crates on piglet survival rate and sow stress level during farrowing. Animals, 12(6), 745.
4. Damm, B. I., Vestergaard, K. S., Schrøder-Petersen, D. L., & Ladewig, J. (2000). The effects of branches on prepartum nest building in gilts with access to straw. Applied Animal Behaviour Science, 69(2), 113-124.
5. Damm, B. I., Forkman, B., & Pedersen, L. J. (2005). Lying down and rolling behaviour in sows in relation to piglet crushing. Applied Animal Behaviour Science, 90(1), 3-20. doi:10.1016/j.applanim.2004.08.008
6. Danholt, L., Moustsen, V. A., Nielsen, M. B. F., & Kristensen, A. R. (2011). Rolling behaviour of sows in relation to piglet crushing on sloped versus level floor pens. Livestock Science, 141(1), 59-68.
7. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., . . Schmidt, G. (2022). Welfare of pigs on farm. EFSA Journal, 20(8), e07421.

8. European Parliament. (2021). End the cage age (1st ed.) Routledge. doi:10.4324/9781315203324
9. Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: A free, versatile open□source event□ logging software for video/audio coding and live observations. Methods in Ecology and Evolution, 7(11), 1325-1330.
10. Gan, H., Menegon, F., Sun, A., Scollo, A., Jiang, Q., Xue, Y., & Norton, T. (2024). Peeking into the unseen: Occlusion-resistant segmentation for preweaning piglets under crushing events. Computers and Electronics in Agriculture, 219, 108683.
11. Grieco, F., Bernstein, B. J., Biemans, B., Bikovski, L., Burnett, C. J., Cushman, J. D., . . . Homberg, J. R. (2021). Measuring behavior in the home cage: Study design, applications, challenges, and perspectives. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 15, 735387.
12. Gu, Z., Xin, H., Wang, C., Shi, Z., Liu, Z., Yang, F., … Li, B. (2010). Effects of neoprene mat on diarrhea, mortality and foreleg abrasion of pre-weaning piglets. Preventive Veterinary Medicine, 95(1-2), 16-22.
13. Jeon, J. H., Kim, D. J., Han, J. H., Yeon, S. C., Bahng, S. H., Myeong, B. S., & Chang, H. H. (2005). Use of a crush-reducing device to decrease crushing of suckling piglets by sows. Journal of Animal Science, 83(6), 1397-1402.
14. Johnson, A. K., & Marchant-Forde, J. N. (2009). Welfare of pigs in the farrowing environment. The welfare of pigs (pp. 141-188) Springer.
15. KilBride, A. L., Mendl, M., Statham, P., Held, S., Harris, M., Cooper, S., & Green, L. E. (2012). A cohort study of preweaning piglet mortality and farrowing accommodation on 112 commercial pig farms in england. Preventive Veterinary Medicine, 104(3), 281-291. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.11.011
16. Liu, T., Kong, N., Liu, Z., Xi, L., Hui, X., Ma, W., ..Yang, X. (2022). New insights into factors affecting piglet crushing and anti-crushing techniques. Livestock Science, 265, 105080. doi:10.1016/j.livsci.2022.105080
17. EFSA Panel. (2008). Scientific opinion of the panel on animal health and welfare on a request from the european commission on animal health and welfare aspects of avian influenza and the risk of its introduction into the EU poultry holdings. The EFSA Journal, 715, 1-161.
18. Thodberg, K., Jensen, K. H., Herskin, M. S., & Jørgensen, E. (1999). Influence of environmental stimuli on nest building and farrowing behaviour in domestic sows. Applied Animal Behaviour Science, 63(2), 131-144.

PROTOCOLLI PER IL MONITORAGGIO E CONTROLLO AMBIENTALE NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI

PROTOCOLS FOR ENVIRONMENTAL MONITORING AND CONTROL ON PIG FARMS

URBANI R.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Legnaro, Padova

Parole chiave: benessere; sanità; controllo ambientale;
Keywords: welfare; health; environmental control;

Riassunto
L'ambiente di allevamento influenza il benessere, la salute e la produttività. La normativa italiana stabilisce dei requisiti per determinati parametri ambientali che devono essere rispettati e controllati nell'ambito dei controlli ufficiali. Per tali motivi è importante progettare correttamente le strutture di stabulazione e monitorare periodicamente i parametri ambientali. Il periodo di formazione si è svolto in Spagna presso l'azienda "Confort Porcino" del Dott. Joan Escobet Riu. Le visite specialistiche agli allevamenti venivano richieste in seguito a problemi sanitari e di benessere animale. Ciascun allevamento è stato visitato seguendo un protocollo operativo e mediante l'utilizzo di specifici strumenti quali: misuratore della qualità dell'aria, anemometro, tachimetro, termocamera, termometro di superficie, manometro e generatore di fumo. I dati raccolti sono stati elaborati in un report finale dove venivano presentate le soluzioni migliorative da attuare. I risultati ottenuti evidenziano che negli allevamenti le principali problematiche sono legate alla circolazione dell'aria, alla creazione di correnti e all'isolamento termico della struttura. Le soluzioni da intraprendere possono prevedere piccole modifiche strutturali, alcune accortezze nella regolazione del sistema di ventilazione, oppure una riprogettazione dell'impianto di ventilazione. Questa esperienza è stata fondamentale per acquisire conoscenze nel controllo e monitoraggio ambientale, ambito sempre più rilevante per la suinicoltura italiana.

Abstract
The rearing environment influences welfare, health and productivity. Italian legislation sets requirements for specific environmental parameters that must be respected and monitored as part of official controls. For these reasons, it is essential to design housing facilities correctly and to monitor environmental parameters periodically. The training period took place in Spain at the "Confort Porcino" of Dr. Joan Escobet Riu. Specialist visits to the farms were requested following health and animal welfare problems. Each farm was visited following an operational protocol and using specific instruments such as an air quality measuring instrument, anemometer, tachometer, thermo-camera, surface thermometer, manometer and a smoke generator. The data collected were processed in a final report, in which the improvement solutions to be implemented were presented. The results show that the main problems on farms are related to air circulation, the creation of currents and the thermal insulation of the structure. The solutions may involve minor structural modifications, some fine-tuning of the ventilation system, or a redesign of the ventilation system. This experience was fundamental in acquiring environmental control and monitoring knowledge, which is becoming increasingly relevant for Italian pig farming.

INTRODUZIONE

Negli anni passati, i programmi di miglioramento genetico hanno spinto verso la selezione di animali ad elevata produttività. Questo ha permesso di massimizzare le produzioni ma ha anche reso gli animali più sensibili a problemi sanitari, riproduttivi e ne ha ridotto la capacità di adattamento all'ambiente in cui vivono (Van Der Waaij, 2004). Tale fenomeno, ha interessato anche il suino, per il quale sono state selezionate linee genetiche estremamente prolifiche e a rapida crescita.

In particolare, cambiamenti repentini delle condizioni ambientali, determinano variazioni del comportamento, dello stato di benessere e di salute degli animali (Escobet Riu, 2020). Ad esempio, valori di temperatura ambientali elevati influenzano il comportamento dei suini, che tendono ad assumere una posizione di decubito laterale per aumentare la superficie corporea a contatto con il pavimento (Aarnink et al., 2006). Questo fenomeno si manifesta tipicamente in suini adulti che, infatti, risultano particolarmente sensibili ad alte temperature, in relazione alla loro scarsa capacità di termoregolazione.

Diversamente, gli animali giovani sono particolarmente sensibili alle basse temperature che, specialmente nei primi giorni dopo la nascita, possono determinare fenomeni di ipotermia nel caso in cui la temperatura corporea interna scenda al di sotto dei 35°C. Per compensare ciò, tendono a mettere in atto comportamenti atti a ricercare fonti di calore come raggrupparsi fra di loro e con la scrofa. (Villanueva-García et al., 2021).

In altri casi, inadeguate condizioni ambientali, possono contribuire assieme ad altri fattori ad innescare l'insorgenza di comportamenti anomali. Un esempio è il fenomeno della morsicatura della coda, che, pur presentando un'eziologia multifattoriale, è noto possa in parte essere scatenato da condizioni ambientali non idonee quali ad esempio l'esposizione a correnti di aria (Boyle et al., 2022).

Nel lungo periodo, invece, condizioni ambientali inadeguate possono portare ad una diminuzione delle *performance* produttive: ad esempio, temperature elevate e stress da caldo portano ad una riduzione dell'ingestione volontaria di alimento e quindi a *performance* inferiori negli animali (Collin et al., 2001; Renaudeau et al., 2011).

Il D.Lgs 146/2001 e il D.Lgs 122/2011 forniscono indicazioni circa l'idoneità dell'ambiente di allevamento in relazione ad alcuni parametri ambientali, specificando che quest'ultimi devono essere mantenuti entro limiti non dannosi per gli animali. Per la verifica di tali condizioni di allevamento, nel 2019 il Ministero della Salute in collaborazione con il CReNBA (Centro di referenza nazionale per il benessere animale), ha sviluppato il sistema ClassyFarm, che regolamenta e fornisce indicazioni più specifiche sui livelli di *comfort* ottimali per temperatura, umidità, ammoniaca, anidride carbonica, illuminazione e rumore (Buoio et al., 2023; Ministero della Salute et al., 2024).

Infine, la crescente sensibilità verso la sostenibilità ambientale e il risparmio energetico, sta spingendo gli allevatori verso una corretta progettazione delle strutture di allevamento e l'adeguamento delle strutture preesistenti. Pertanto, una corretta gestione ambientale e un'idonea progettazione non sono solo fondamentali a garantire la salute, il benessere e la produttività dei suini, ma possono avere ripercussioni positive anche sulla sostenibilità dell'allevamento.

L'obiettivo di questa esperienza di formazione all'estero è stato quello di apprendere come applicare un corretto iter per valutare l'idoneità delle condizioni ambientali e per diagnosticare eventuali problematiche in un allevamento suino, mediante l'utilizzo di specifici strumenti; successivamente, sulla base delle informazioni raccolte proporre soluzioni migliorative da applicare. Tutto questo è stato possibile grazie all'affiancamento ad un esperto nel settore del controllo e del monitoraggio ambientale.

MATERIALI E METODI

Il periodo di tirocinio si è svolto dal 7 ottobre al 27 ottobre 2023 presso l'azienda "Confort Porcino" del Dott. Joan Escobet Riu in Spagna e le attività si sono svolte nei territori di Barcellona, Murcia, Saragozza e Lleida.

Sono state effettuate consulenze ambientali specialistiche in aziende suinicole, generalmente richieste in presenza di problemi sanitari e di benessere (fenomeni di diarrea, morsicatura di coda e orecchie), oppure nell'ottica di riformare e modernizzare una struttura di allevamento. Per iniziare, veniva programmata una visita in allevamento finalizzata alla raccolta dei dati ambientali. La visita iniziava con un disegno planimetrico del capannone che si andava a monitorare e la raccolta dei dati relativi alla sua ubicazione, importante per valutare l'azione dei venti dominanti e venti locali sulla struttura.

Venivano quindi riportati:

- Numero di animali per stanza e numero di box (es: box parto, box svezzamento);
- Descrizione e dimensione della stanza (lunghezza, larghezza, altezza, superficie totale, volume totale);
- Numero, posizione e dimensione delle finestre e di eventuali aperture sul corridoio di servizio per l'entrata di aria;
- Numero, posizione e dimensione dei ventilatori;
- Numero, posizione e dimensione dei camini;
- Numero, posizione e dimensione dei *cooling* per il sistema di raffrescamento;
- Numero, posizione e tipologia del sistema di riscaldamento;
- Numero e posizione delle sonde ambientali che regolano il sistema di ventilazione automatico.

A seconda della categoria produttiva presente e del numero di animali venivano considerate le diverse esigenze in termini di *comfort* termico e di necessità di rinnovo dell'aria all'interno della stanza, che dove essere garantita da un adeguato sistema di ventilazione.

Seguivano delle misurazioni in allevamento, mediante appositi strumenti per il controllo ambientale, con lo scopo di raccogliere dati relativi a:

- Temperatura, umidità, CO_2 e NH_3 (quali indicatori della qualità dell'aria), raccolti in vari punti della stanza;
- Velocità dell'aria, misurata mediante anemometro;
- Velocità di rotazione della ventola, misurata mediante tachimetro;
- Differenza di pressione fra il corridoio e l'interno della stanza, misurata mediante un manometro. La differenza di pressione risulta fondamentale per generare un flusso e un movimento di aria fra i due ambienti.
- Temperatura delle pareti della stanza e, quando presente, la temperatura del nido dei suinetti in sala parto, mediante l'utilizzo di una termocamera o di un termometro di superficie;
- Movimento dell'aria all'interno degli ambienti, eventuale presenza di correnti d'aria ed ermeticità della stanza, mediante l'utilizzo del generatore di fumo. Le prove con il fumo venivano svolte andando a modificare l'apertura delle finestre e la velocità del ventilatore, simulando così una condizione di ventilazione minima (tipica in inverno) e massima (in estate). Il fumo veniva utilizzato nel corridoio di servizio e in prossimità delle aperture della stanza che ospitava gli animali, per valutare il flusso di aria che si generava all'interno della stanza;
- Stato di consumo dei *cooling* e la loro funzionalità.

I dati raccolti venivano successivamente elaborati in un report finale, nel quale venivano elencate le misurazioni effettuate, le problematiche ambientali riscontrate e proposte delle soluzioni migliorative. Le azioni correttive potevano riguardare una completa

riprogettazione dell'allevamento e del sistema di ventilazione, delle piccole modifiche strutturali oppure, più semplicemente, alcune accortezze nella regolazione del sistema di ventilazione.
Con lo scopo di conoscere le diverse tipologie di prodotti disponibili per la ventilazione e il controllo ambientale e le loro applicazioni nella produzione zootecnica, sono state visitate aziende specializzate nella produzione di attrezzature e sistemi di costruzione per il settore zootecnico.
Le visite hanno previsto:

- la presentazione iniziale delle aziende, della loro *mission* e dei servizi offerti;
- la visita ai magazzini delle aziende e la visione dei loro prodotti zootecnici in ambito suinicolo;
- la visita agli allevamenti suini progettati e realizzati dalle aziende durante la quale sono stati illustrati la progettazione, l'organizzazione e il funzionamento del sistema di ventilazione.

Infine, sono stati approfonditi e discussi, mediante la partecipazione a seminari e gruppi di lavoro, i fabbisogni ambientali fisiologici delle diverse categorie produttive (suinetti, suini svezzati, suini da ingrasso e scrofe) e le tipologie di ventilazione presenti negli allevamenti suinicoli (naturale e forzata).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il controllo ambientale negli allevamenti ha previsto l'utilizzo di specifici strumenti per la misurazione dei parametri ambientali. La scelta di quali strumenti utilizzare dipendeva dall'anamnesi che veniva raccolta relativa alle problematiche negli animali, dalla tipologia di struttura e dall'esperienza del Dott. Joan Escobet Riu.
Durante i sopralluoghi nelle aziende, sono stati raccolti i dati relativi all'ubicazione dell'allevamento e la sua posizione rispetto ai venti dominanti. La condizione ideale prevede l'orientamento del capannone di allevamento lungo l'asse est- ovest, ottimale per garantire un buon ricambio di aria e un'adeguata protezione dai raggi solari e dal riscaldamento, oltre che per rendere più efficiente il sistema di ventilazione. Inoltre, i ventilatori dovrebbero essere posizionati nella parete non esposta direttamente ai venti dominanti. Nel caso di allevamenti preesistenti, risulta difficile modificare l'ubicazione ma possono essere adottati sistemi di protezione dei ventilatori a parete per evitare il flusso d'aria costante contro di essi.
Per quanto riguarda la misurazione di temperatura, umidità, CO_2 e NH_3, i valori raccolti hanno fornito un'indicazione istantanea della qualità dell'aria e per tale motivo sono stati confrontati con quanto registrato dal sistema di controllo automatizzato. Infatti, tutti gli allevamenti visitati erano provvisti di un sistema automatizzato per il controllo della ventilazione. I sistemi di controllo ambientali automatizzati offrono grandi vantaggi, permettendo di regolare in maniera autonoma apertura delle finestre e velocità della ventola per mantenere la temperatura all'interno di un *range* di valori ottimali per quella categoria produttiva. Inoltre, permettono di memorizzare e impostare curve di temperatura differenti e specifiche per le diverse stagioni. Tuttavia, va considerato che ciascun allevamento è una realtà differente: presenta strutture di stabulazione diverse, sistemi di ventilazione diversi e ubicazione diversa. Pertanto, il programma di monitoraggio ambientale è personalizzato secondo le singole esigenze della struttura.
I valori di velocità dell'aria e velocità di rotazione della ventola sono stati confrontati con le specifiche tecniche dell'impianto di ventilazione riportate nella scheda del prodotto. Infatti, un aspetto che deve essere tenuto in considerazione al momento dell'installazione,

è che i ventilatori in allevamento sono soggetti a condizioni che ne riducono l'efficienza rispetto a quella testata in condizioni ottimali di laboratorio (Escobet Riu, 2019).
Anche la differenza di pressione fra i due ambienti, nello specifico fra il corridoio e la stanza di stabulazione rientrava nel *range* ottimale. Questa, infatti, serve per generare un movimento di aria e un flusso costante. Un'assenza di differenza di pressione può in parte essere dovuta alla scarsa ermeticità dell'ambiente di stabulazione. Infatti, nel momento dello svolgimento del test e per l'idoneità dello stesso, la porta di ingresso alla stanza di stabulazione doveva essere mantenuta chiusa.
Le criticità maggiori riguardavano principalmente il movimento dell'aria all'interno degli ambienti e l'isolamento termico della struttura di stabulazione. La prova del fumo (Figura 1), infatti, molto spesso ha evidenziato dei movimenti anomali dell'aria con la creazione di correnti che colpivano direttamente gli animali. In altri casi invece e in determinati punti il movimento dell'aria era praticamente assente. Questo determina una ventilazione inadeguata e non omogena all'interno di uno stesso ambiente. In alcune aziende il problema è stato risolto reindirizzando il flusso d'aria in ingresso dalle finestre o regolando la velocità del ventilatore. In altri casi, sono stati proposti degli interventi strutturali più importanti al fine di modificare completamente il sistema di ventilazione, come ad esempio l'aggiunta di finestre per l'ingresso dell'aria o l'utilizzo di ventilatori a camino invece che a parete. La prova del fumo è sempre stata condotta in tutte le strutture. La difficoltà di tale prova era legata principalmente al fatto che alcuni generatori di fumo dovevano essere costantemente collegati alla corrente elettrica, mentre altri necessitavano di un periodo di carica per essere utilizzati. Inoltre, affinché la prova fosse valida ed efficace, il flusso di fumo doveva essere correttamente indirizzato.

Figura 1: prova del fumo (foto di Dott. Escobet Riu)
***Figure 1*:** smoke test (credit to Dr. Escobet Riu)

Per quanto riguarda l'isolamento termico, valutato mediante la prova del fumo e l'utilizzo della termocamera (Figura 2), la maggior parte delle aziende visitate più datate non era ben isolata. Si tratta di un aspetto critico sia nei mesi estivi, dove le temperature raggiungono livelli elevati, sia in inverno perché impone di riscaldare maggiormente l'ambiente di allevamento. Tra le possibili azioni correttive vi sono l'utilizzo di una copertura isolante nei tetti o di vernice bianca isolante. Inoltre, in estate possono essere utilizzati degli ombreggianti

in prossimità delle finestre e predisposti dei *cooling* per il raffrescamento. In inverno, invece, è stato consigliato di rimuovere, pulire e conservare i pannelli del *cooling* e di predisporre una protezione esternamente al sistema di *cooling* che garantisce un minor ingresso di aria e corrente fredda in allevamento e migliora l'isolamento termico della struttura.
L'utilizzo della termocamera a questo scopo è stato particolarmente utile, anche se è necessario conoscere l'emissività del materiale che si sta analizzando.

Figura 2: utilizzo della termocamera per valutare lo stato di isolamento termico dell'edificio (foto di Dott. Escobet Riu)
Figure 2: using the thermo-camera to assess the thermal insulation status of the building (credit to Dr. Escobet Riu)

L'utilizzo del termometro di superficie, invece, si è verificato utile per la valutazione della temperatura del nido (quando presente), fondamentale per garantire un corretto *comfort* termico ai suinetti sottoscrofa.
Lo studio di come e quanto la componente ambientale impatta sul benessere, sulla salute e sulla produttività degli animali, è particolarmente complesso, non immediato e richiede molta esperienza in tale ambito. Un punto di partenza iniziale e fondamentale è la sensibilizzazione degli allevatori sull'importanza di tali aspetti e delle ripercussioni sul benessere degli animali. Un allevatore, se correttamente informato, è ben disposto ad investire su una consulenza ambientale e sul miglioramento della propria struttura. Inoltre, alcune delle soluzioni sopra proposte possono essere adottate e applicate anche negli allevamenti italiani. In particolare, visto il crescente aumento delle temperature in estate, gli allevamenti dovrebbero dotarsi di sistemi di ventilazione idonei, sistemi di raffrescamento e un buon isolamento delle strutture. Infine, in tale attività, la figura del veterinario è essenziale in quanto mette al centro il benessere e le esigenze dall'animale offrendo all'allevatore delle soluzioni realizzabili, tenendo in considerazione anche l'investimento economico. Tuttavia, l'implementazione e la progettazione di sistemi di monitoraggio ambientale richiede anche capacità e conoscenze tecniche di natura ingegneristica e, per tale motivo, la collaborazione e il supporto di figure e aziende specializzate nella produzione di attrezzature e sistemi di costruzione per il settore zootecnico risulta importante per la risoluzione di un problema e per impostare un programma di monitoraggio dell'ambiente di allevamento.

CONCLUSIONI

L'esperienza di formazione all'estero ha previsto sia una formazione teorica che pratica. La formazione teorica è stata essenziale per comprendere meglio le esigenze fisiologiche delle categorie produttive di suini e per approfondire i diversi sistemi e tipologie di ventilazione presenti in allevamento. La parte pratica, invece, ha permesso di focalizzarsi sull'individuazione e la risoluzione di problemi legati al *comfort* dei suini mediante l'applicazione di un corretto iter diagnostico e l'utilizzo di appropriati strumenti per il monitoraggio ambientale.

Questa esperienza è stata fondamentale per acquisire conoscenze di base nell'ambito del controllo e del monitoraggio ambientale. Tali conoscenze possono essere messe a disposizione degli allevatori offrendo servizi di consulenza, sensibilizzandoli sull'importanza e l'impatto dell'ambiente sulla salute e il benessere degli animali e applicandole nello sviluppo di progetti di ricerca futuri. Inoltre, questa esperienza è stata una grande occasione per esplorare realtà suinicole diverse da quelle italiane e per capire l'importanza che in tali realtà viene data al controllo e al monitoraggio ambientale.

BIBLIOGRAFIA

1. Aarnink, A. J. A., Schrama, J. W., Heetkamp, M. J. W., Stefanowska, J., & Huynh, T. T. T. (2006). Temperature and body weight affect fouling of pig pens. *Journal of Animal Science*, *84*, 2224–2231.
2. BLOG ZONA PORCINO. https://www.zonaporcino.es/joan-escobet-riu.aspx (consultato in data 14/03/2023)
3. Boyle, L. A., Edwards, S. A., Bolhuis, J. E., Pol, F., Šemrov, M. Z., Schütze, S., Nordgreen, J., Bozakova, N., Sossidou, E. N., & Valros, A. (2022). The Evidence for a Causal Link Between Disease and Damaging Behavior in Pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*.
4. Buoio, E., Cialini, C., & Costa, A. (2023). Air Quality Assessment in Pig Farming: The Italian Classyfarm. *Animals*, *13*, 2297.
5. ClassyFarm. https://www.classyfarm.it/index.php (consultato in data 14/03/2024)
6. Collin, A., van Milgen, J., Dubois, S., & Noblet, J. (2001). Effect of high temperature on feeding behaviour and heat production in group-housed young pigs. *British Journal of Nutrition*, *86*, 63–70.
7. Confort Porcino. https://www.confortporcino.com/en/ (consultato in data 14/03/2024)
8. Decreto Legislativo n. 146 del 26 marzo 2001. Attuazione della direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 95 del 24 aprile 2001.
9. Decreto Legislativo n. 122 del 7 luglio 2011. Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.178 del 02 agosto 2011.
10. Escobet Riu, J. (2019). Ventiladores (y II): ¿qué nos dicen? y ¿qué vemos en granja?. *SUIS*, *163*, 16-22.
11. Escobet Riu, J. (2020). Aspectos de climatización relacionados con el bienestar porcino. *SUIS*, *173*, 18-24.
12. Ministero della Salute, IZSLER & CReNBA. (2024). Valutazione del benessere animale nella specie suina: manuale esplicativo controllo ufficiale. Disponibile online: https://www.classyfarm.it/images/documents/VET-UFFICIALE_AGGIORNATO_06-23/Manuale_controllo_ufficiale_benessere_suini_rev2_03.01.2024.pdf.
13. Renaudeau, D., Gourdine, J. L., & St-Pierre, N. R. (2011). A meta-analysis of the effects of high ambient temperature on growth performance of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, *89*, 2220–2230.

14. Van Der Waaij, E. H. (2004). A resource allocation model describing consequences of artificial selection under metabolic stress. *Journal of Animal Science*, *82*, 973–981.
15. Villanueva-García, D., Mota-Rojas, D., Martínez-Burnes, J., Olmos-Hernández, A., Mora-Medina, P., Salmerón, C., Gómez, J., Boscato, L., Gutiérrez-Pérez, O., Cruz, V., Reyes, B., & González-Lozano, M. (2021). Hypothermia in newly born piglets: Mechanisms of thermoregulation and pathophysiology of death. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, *9*, 1–10.

RINGRAZIAMENTI
Si ringraziano la SIPAS per avere consentito l'approfondimento della tematica attraverso un periodo di formazione all'estero, il Dott. Joan Escobet Riu per avermi dato la possibilità di affiancarlo in questa esperienza e per avermi trasmesso le sue conoscenze. Ringrazio infine l'IZSVe per consentirmi l'approfondimento della tematica in Italia nell'ambito del Progetto RC 9/22 (CUP: B23C22000930001).

VALUTAZIONE SEMI-QUANTITATIVA DELL'IMPATTO DELLA PESTE SUINA AFRICANA SUGLI ALLEVATORI DI PICCOLA SCALA IN BULGARIA: IL CASO DEL SUINO NERO DEI BALCANI ORIENTALI

SEMI-QUANTITATIVE ASSESSMENT OF AFRICAN SWINE FEVER IMPACT ON SMALLHOLDER FARMERS IN BULGARIA: THE EAST BALKAN SWINE CASE

LAZZARO E.[1,2], DIMITROVA D.[3,4], DONEVA R.[5], GUARDONE L.[2,6], CRISTALLI A.[2], CROVATO S.[1], ANGELONI, G. [1,2]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy;
[2] Veterinari Senza Frontiere Italia, Legnaro (PD), Italy;
[3] Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria;
[4] Slow Food in Bulgaria, 1113 Sofia, Bulgaria;
[5] Association for Breeding and Preserving of the East Balkan Swine, Shumen, Bulgaria;
[6] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino, Italy

Parole chiave: Peste suina africana; suino nero dei Balcani orientali; conservazione della biodiversità
Keywords: African swine fever, East Balkan swine, biodiversity conservation

Riassunto
La Peste Suina Africana rappresenta una minaccia significativa per la produzione suinicola globale, data la sua elevata letalità e capacità di persistere nell'ambiente. Nelle aree dove l'allevamento suino costituisce una fonte fondamentale di proteine e un'importante attività economica, la malattia ha un grave impatto anche sulla sicurezza nutrizionale e sull'autosostentamento. Questo studio, condotto in Bulgaria, ha indagato le dinamiche della gestione della malattia e il suo impatto sugli allevatori suinicoli di piccola scala, coinvolti in interviste insieme ad altri stakeholders (n=32). I risultati evidenziano la vulnerabilità dei metodi tradizionali di allevamento suino e delle razze indigene, come il Suino Nero dei Balcani Orientali, ultima razza suina autoctona della Bulgaria, protagonista dello studio e pesantemente colpita dalla malattia. Il declino di questa razza, fortemente a rischio di estinzione con 388 suini rimanenti, rappresenta una minaccia per la biodiversità e determina un impatto socio-economico sugli allevatori, che spesso non dispongono delle risorse finanziarie utili ad adottare le misure di controllo richieste. Lo studio ha permesso un confronto con gli allevatori e le autorità competenti, evidenziando come il bilanciamento delle misure di controllo delle malattie e la conservazione delle pratiche di allevamento tradizionali e delle razze in via di estinzione presenta una sfida socio-economica ed ambientale complessa, ma che merita cruciale attenzione.

Abstract
African Swine Fever represents a significant threat to global swine production, given its high lethality and ability to persist in wild boar populations and the environment. In countries and areas where pig farming is a key source of protein and an important economic activity, the disease also has a serious impact on nutritional security and self-sustainability. This study, conducted in Bulgaria, investigated the dynamics of disease management and its impact on

small-scale pig farmers, who were interviewed along with other stakeholders (n=32), including health authorities and local veterinarians. The results highlight the vulnerability of traditional pig farming methods and indigenous breeds, such as the East Balkan Swine, the last indigenous swine breed in Bulgaria, which was heavily affected by the disease. The decline of this breed, which currently numbers 388 individuals, not only threatens biodiversity in terms of genetic heritage and derivative products but also has a socio-economic impact on farmers in rural Bulgarian areas, who often lack the financial resources to implement required control measures. The study facilitated dialogue with farmers and relevant authorities, emphasizing how balancing disease control measures with the preservation of traditional farming practices and endangered breeds poses a complex socio-economic and environmental challenge, but one that is of crucial importance.

INTRODUZIONE

La peste suina africana (PSA), malattia virale che colpisce i suidi e ormai ben nota in Europa, costituisce una minaccia significativa per la produzione suinicola e la gestione della fauna selvatica [1,2]. La persistenza della PSA è alimentata dalla notevole stabilità del virus nell'ambiente e all'interno delle carcasse di animali, che porta all'instaurarsi di un "ciclo cinghiale-habitat" [1].

Nonostante l'identificazione del virus della PSA risalga a quasi un secolo fa, l'assenza di un vaccino altamente efficace ha spostato l'attenzione delle misure di controllo verso la diagnosi precoce, la quarantena, i protocolli di biosicurezza, le restrizioni ai movimenti degli animali e le politiche di abbattimento [3–6]. Nelle aree dove l'allevamento suino costituisce una fonte fondamentale di proteine e un'importante attività economica, la malattia ha un grave impatto anche sulla sicurezza nutrizionale e sull'autosostentamento [3].

Le recenti epidemie di PSA in Europa hanno colpito principalmente i backyard, che solitamente presentano misure di biosicurezza meno rigide rispetto a quelli commerciali [7]. Questo ha portato a una significativa diminuzione del numero di tali allevamenti, soprattutto nei Paesi dell'Europa orientale, dove rappresentano ancora una parte importante del settore suinicolo [7]. Tuttavia, le ricerche riguardanti i fattori di rischio della PSA associati agli allevamenti di piccola scala, la capacità di trasmissione del virus in base al tipo di allevamento e le relative valutazioni delle misure di biosicurezza risultano carenti [8]. L'ultimo parere dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) sottolinea inoltre la mancanza di una definizione armonizzata degli allevamenti *outdoor* nella documentazione dell'Unione Europea (UE), nonostante esistano diverse categorizzazioni nazionali [9]. In particolare, la mancanza di definizioni standardizzate di "*outdoor pig farming*", "*free-range pig farming*" e simili nella legislazione UE complica ulteriormente la valutazione dei fattori di rischio e la quantificazione dell'impatto della PSA, poiché le definizioni attuali variano da Paese a Paese [9].

Dopo il primo focolaio di PSA in Bulgaria nell'Agosto 2018, la malattia e le relative misure contenitive hanno causato una drastica diminuzione degli allevamenti di suini (73,8%) [10,11]. I backyard (che nella legislazione bulgara comprendono meno di 3 suini per allevamento), considerati particolarmente vulnerabili all'introduzione della PSA e molto diffusi in Bulgaria, hanno subito la riduzione più significativa, con una diminuzione del 63,5% nel 2019 [10,11]. Secondo l'Agenzia bulgara per la sicurezza alimentare (BFSA), la distruzione quasi totale degli allevamenti domestici è legata alle campagne di abbattimento [9]. Il Regolamento n. 44, aggiornato nel 2020, ha introdotto un nuovo sistema di registrazione per i backyard, con controlli ufficiali precedenti alla registrazione. Nel 2021, la BFSA ha registrato 6.859 backyard, contro i 29.930 del 2016, segnando un lento processo di ripopolamento [dati forniti da BFSA; Ministero dell'Agricoltura e dell'Alimentazione].

Il caso del suino nero dei Balcani orientali (East Balkan Swine, EBS) aggiunge un capitolo

significativo alla narrazione della PSA fungendo da caso studio applicabile a molte realtà italiane ed europee. Questa razza, designata come Presidio dalla Fondazione Slow Food, è l'ultima razza suina autoctona della Bulgaria e ha una lunga tradizione di allevamento *outdoor* nelle aree forestali della zona orientale del Paese, comprese nelle regioni di Burgas, Varna e Shumen [12].

Figura 1. Mappa dei territori in cui la razza EBS può essere ufficialmente allevata (delimitati in rosso)
Figure 1. *Map of the territories where EBS breed can be officially farmed (delimited in red)*

Prima della PSA, i suini EBS venivano allevati al pascolo e nelle foreste durante il giorno, tenuti chiusi in recinti di legno durante la notte e per il parto delle scrofe [12,13]. Il predecessore di questa razza, un suino del Sud-Est asiatico, fu introdotto dai Bizantini sulla costa del Mar Nero 2500 anni fa [12]. Il risultato dell'incrocio di questi suini con il *Sus mediterraneus* e il cinghiale europeo (*Sus scrofa scrofa*) fu una nuova razza denominata "East Balkan Swine" da Hlebarov nel 1921[12]. Nonostante la loro diffusione nel Paese fino alla metà del XX secolo, quando rappresentavano oltre il 65% del numero totale di suini, il numero di EBS si è progressivamente ridotto, a causa della promozione di razze più produttive da parte del regime comunista, della migrazione dalle campagne alle città e della trasformazione degli allevamenti tradizionali in produzioni suine industriali [12,14]. Tuttavia, la loro carne di alta qualità e il loro profondo legame con la cultura alimentare bulgara hanno spinto il Ministero dell'Agricoltura e dell'Alimentazione a riconoscere ufficialmente la razza e a costituire un'associazione di razza nel 2006 (Associazione per l'Allevamento e la Conservazione dei Suini dei Balcani Orientali, ABPEBS). La carne di EBS si distingue per il suo alto contenuto di grasso intramuscolare (5,38%), che conferisce al prodotto qualità sensoriali e sapore distintivi, e per il maggiore livello di acidi grassi polinsaturi (PUFA), con un aumento del 4-6% nei suini allevati *outdoor* rispetto a quelli alimentati con concentrati [15–19]. Fino al 2018, i prodotti a base di carne di EBS erano presenti sul mercato attraverso la catena METRO, ma l'arrivo della PSA ha interrotto l'attività commerciale, con relativa

sospensione della designazione della "carne di EBS" come prodotto DOP nell'ambito dei sistemi di qualità dell'UE [comunicazione personale: R. Doneva, presidente di ABPEBS]. Per salvaguardare la razza, l'Agenzia esecutiva per la selezione e la riproduzione in allevamento (EASRAB) gestisce e mantiene due stazioni statali di inseminazione artificiale (SATIS) a Sofia e Sliven, che si occupano di allevamento e conservazione delle risorse genetiche e includono 189 suini EBS sottoposti a misure di selezione. L'ultimo report ministeriale ha riportato 1056 suini EBS abbattuti dalla fine del 2019 alla fine del 2022, con una popolazione attuale di 388 individui a rischio di consanguineità e potenziale estinzione [20].
Per comprendere appieno l'impatto della PSA sulla popolazione di EBS, è fondamentale avere una panoramica completa della legislazione bulgara relativa alla loro gestione.
Il Regolamento n. 6 disciplina le condizioni e la procedura per il pascolo delle mandrie di EBS e dei suoi incroci. Nella complicata situazione epizootica dovuta alla PSA, l'allevamento *outdoor* di EBS è vietato a tempo indeterminato, rendendo obbligatoria la permanenza degli animali in aree recintate. Attualmente, le aree con le caratteristiche richieste sono spesso utilizzate da altri (e.g., cacciatori) o sono risorse pubbliche che richiedono autorizzazione delle autorità competenti per essere recintate. Questo scenario impedisce agli allevatori di EBS di garantire il livello di biosicurezza richiesto. Inoltre, manca una legislazione specifica che regoli il commercio dei prodotti suini degli allevatori di piccola scala. Infatti, il Regolamento n. 26, che disciplina la consegna diretta ai consumatori finali e ai mercati agricoli locali dei prodotti primari, non include la carne suina e i suoi produttori tra le categorie regolamentate. I limiti sono legati anche alle procedure di macellazione, poiché ad oggi nessun macello autorizzato è disponibile per accettare suini di razza EBS. Inoltre, il Regolamento n. 10, che fornisce linee guida specifiche per l'uso di stazioni di macellazione, stabilisce che queste ultime possano servire la struttura zootecnica solo se affiliata a un gruppo o a un'organizzazione di produttori. Tuttavia, questo criterio non si applica agli allevamenti EBS, in quanto queste organizzazioni devono fornire prove di precedenti entrate dalla vendita dei prodotti, condizione non soddisfatta dagli allevatori EBS post-epidemia.
Queste restrizioni legislative non solo creano un'ulteriore sfida per gli allevatori di EBS, ma hanno anche un impatto significativo sulla sopravvivenza della razza. In questo contesto, promuovere dialogo e collaborazione tra le parti interessate è cruciale per preservare la diversità genetica e il tessuto culturale delle comunità agricole. Una migliore comprensione dei diversi fattori di rischio associati alla diffusione della PSA, definizioni legislative più precise e iniziative per la conservazione culturale, possono contribuire a rafforzare gli sforzi volti a contrastare questa malattia virale. Questo studio si concentra sull'analisi dell'impatto della PSA sugli allevatori di piccola scala, con particolare attenzione rivolta agli EBS, evidenziando la necessità di azioni mirate per proteggere e sostenere le razze suine autoctone di tutta Europa.

MATERIALI E METODI

Questo studio ha utilizzato un approccio di tipo misto, comprendente tre missioni condotte tra Ottobre 2022 e Luglio 2023 in Bulgaria (Fig. 2), concentrandosi sui territori definiti dal Regolamento n. 6 per l'allevamento dei suini EBS (Fig. 1). Lo studio ha esaminato gli effetti della PSA sugli allevatori di piccola scala e sulle razze locali, concentrando l'attenzione sugli EBS. La ricerca è stata condotta in tre fasi: interviste sul campo (Ottobre 2022), incontri con le autorità con discussione delle politiche e possibili strategie (Dicembre 2022), ulteriori interviste e attività di advocacy (Giugno-Luglio 2023). Mantenere la continuità delle informazioni è stato cruciale, considerando il cambio di governo nella primavera del 2023.

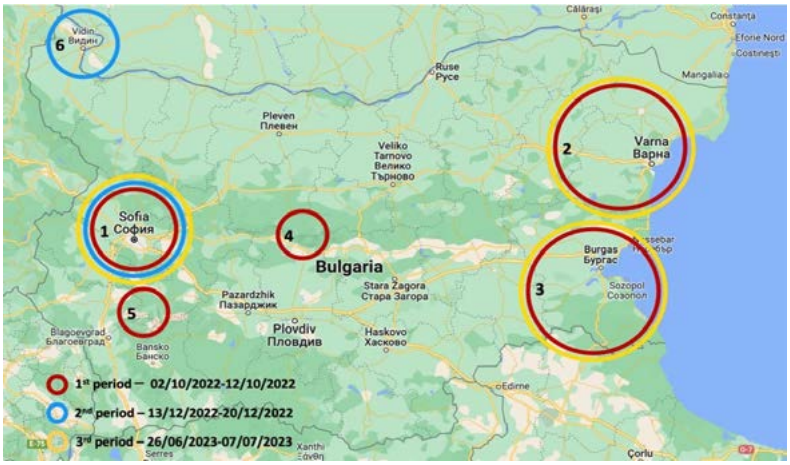


Figura 2. Mappa riassuntiva delle visite effettuate durante la prima (in rosso), seconda (in blu) e terza (in giallo) missione
Figure 2. Map resume of the visits done during the first (in red) second (in blue) and third (in yellow) missions

1. Sofia 2. Shumen; Varna 3. Burgas; Indzhe Voyvoda 4. Karlovo 5. Blagoevgrad; Gorno Draglishte 6. Vidin

2022
Il lavoro preliminare ha incluso una revisione ampia della letteratura sulla PSA in Bulgaria, seguita dalla preparazione di interviste semi-strutturate. In seguito alla mappatura degli stakeholders, sono state eseguite 16 interviste (Tab. 1) e sono stati visitati allevamenti di piccola scala. Successivamente, i dati sono stati discussi con le autorità veterinarie bulgare per formulare strategie di supporto ai sistemi di allevamento tradizionali durante le emergenze sanitarie.

Meeting	Numero di incontri	Stakeholder
2022	6	Allevatori ed ex-allevatori di EBS
	4	Allevatori ed ex-allevatori di backyard
	1	Presidente dell'Associazione degli allevamenti di suini industriali
	1	Presidente della Fondazione Bioselena
	1	Presidente dell'Associazione per l'Allevamento e la Conservazione dei Suini dei Balcani orientali (ABPEBS)
	1	Presidente dell'Agenzia esecutiva per la selezione e la riproduzione in allevamento (EASRAB)
	1	Ministero dell'Agricoltura e dell'Alimentazione
	1	Risk Assessment Center on Food Chain
2023	7	Allevatori ed ex-allevatori di EBS
	4	Professionisti del settore forestale
	2	Comune di Smyadovo (sindaco, assistente)
	3	Professori dell'Università di Trakia

Tabella 1. Numero e scopo degli incontri condotti in Bulgaria (2022-2023)
Table 1. Number and purpose of the meetings conducted in Bulgaria (2022–2023) 2023

Il lavoro ha incluso un aggiornamento della letteratura al 2023, e lo sviluppo di due questionari da sottoporre (i) agli allevatori di suini bulgari e (ii) ad altri soggetti coinvolti nel quadro della PSA.
Nel contesto del progetto DEFEND, è stato organizzato un workshop a Sofia dal titolo "Impact of ASF on backyards and minor breeds in Eastern EU Countries" il 29-30 Giugno 2023, offrendo una piattaforma per discutere strategie di supporto ai sistemi di allevamento tradizionali durante le epidemie di PSA in Europa (Tab. 2).

Speakers	**Paese**
Ministero dell'Agricoltura e dell'Alimentazione	Bulgaria
Risk Assessment Center on Food Chain	Bulgaria
Associazione per l'allevamento e la conservazione dei suini dei Balcani orientali (ABPEBS)	Bulgaria
Agenzia esecutiva per la selezione e la riproduzione in allevamento (EASRAB)	Bulgaria
Slow Food Bulgaria	Bulgaria
Friedrich-Loeffler-Institut	Germania
Associazione degli allevatori di suini Mangalica	Ungheria
Slow Food Italia	Italia
Veterinari Senza Frontiere Italia	Italia
Associazione degli allevatori di suini di Bazna	Romania
Istituto Scientifico Veterinario "Novi Sad"	Serbia
Università di Castiglia	Spagna

Tabella 2. Relatori coinvolti nel workshop
Table 2. Speakers involved in the workshop

I questionari, nelle due diverse versioni, sono stati distribuiti sia in forma fisica durante la missione sia online tramite Google Form, con link condiviso nei canali dei social network a Luglio e Agosto 2023.
Entrambi i questionari includevano domande a risposta chiusa e a risposta aperta; obbligatorie e facoltative, con la sezione conclusiva dedicata a domande con scala di valutazione, volte a valutare la percezione delle misure preventive contro la PSA.
Il (i) questionario, composto da 36 domande principalmente a risposta chiusa, è stato suddiviso in tre sezioni: dati demografici e aziendali; impatto della PSA sugli allevamenti di suini; valutazione della percezione della PSA.
Il (ii) questionario, composto da sette domande, prevalentemente a risposta aperta, era strutturato in due sezioni: dati demografici e sull'azienda; valutazione della percezione della PSA.
I risultati dei questionari sono stati raccolti e organizzati in una matrice con Microsoft Excel, quindi analizzati con tabelle pivot per creare mappe e grafici. Veterinari Senza Frontiere Italia ha collaborato alla revisione della metodologia e alla raccolta dei dati nell'ambito del progetto DEFEND.

RISULTATI

I risultati riflettono una metodologia complessa che incorpora (1) interviste semi-strutturate, (2) incontri con le autorità, (3) un workshop specializzato e (4) l'uso di questionari strutturati. Questo approccio multidisciplinare esplora diversi aspetti relativi al controllo della PSA e al suo impatto in Bulgaria.

1. **Interviste semi-strutturate**

Le interviste semi-strutturate hanno offerto una visione dell'impatto e della percezione della PSA in Bulgaria, concentrando l'attenzione sugli allevatori di EBS.

1. Le sfide affrontate dagli allevatori di EBS: bilanciare tradizione, economia e biosicurezza

Un tratto comune riscontrato tra gli allevatori di EBS intervistati è la radicata tradizione di allevamento degli EBS, tramandata di generazione in generazione, che evidenzia una profonda conoscenza della razza e un forte legame emotivo con gli animali. Tutti gli allevatori intervistati hanno perso intere mandrie a causa delle conseguenze dirette e/o indirette della PSA, con notevoli ripercussioni economiche ed emotive. Prima dell'epidemia, gran parte del loro reddito dipendeva dalla vendita di carne di EBS, rappresentando fino al 60% del loro guadagno annuale [comunicazione personale: R. Doneva, presidente di ABPEBS].

Attualmente, gli allevatori affrontano notevoli sfide logistiche ed economiche nel tentativo di riprendere l'attività. La normativa attuale non fornisce terreni adeguatamente recintati o macelli per i suini EBS, ostacolando la riapertura e registrazione degli allevamenti. Le limitazioni logistiche si combinano con vincoli economici legati al rispetto degli standard di biosicurezza, che richiedono terreni forestali recintati, ma i cui costi sono significativi. Gli allevatori chiedono sovvenzioni per affrontare tali spese iniziali, fondamentali per contrastare non solo la perdita degli animali, ma anche delle conoscenze tradizionali di allevamento, indispensabili per la sopravvivenza e il benessere della razza.

2. Gestione della foresta

In Bulgaria, i 127.000 cacciatori ufficialmente registrati sono autorizzati a cacciare i cinghiali e vendere la loro carne conformemente alle leggi sulla caccia, che ne definiscono i prezzi minimi [21]. In relazione alla PSA, l'implementazione del piano di abbattimento dei cinghiali avviato nel 2018 non è riuscita a raggiungere gli obiettivi prefissati di ridurre la loro densità a 0,3-0,5 animali/100 ha, come richiesto dalla Strategia UE [22]. Nel 2020, la diffusione della PSA ha causato una riduzione del 50% nella popolazione di cinghiali, contribuendo notevolmente al depopolamento pianificato (Tab. 3) [23].

	2017	**2018**	**2019**	**2020**	**2021**
Cinghiali (n.)	94865	100065	97690	50497	40134
Piano di caccia (n.)	63002	81481	81286	43658	32315
Cinghiali cacciati (n.)	45265	45395	40557	18792	-
% del piano rispettato	71.8	55.7	49.9	43	-

Tabella 3. Numero di cinghiali in Bulgaria per il periodo 2017-2021 (Agenzia forestale esecutiva)

Table 3. Number of wild boars in Bulgaria for the period 2017-2021 (Executive Forest Agency)

L'Agenzia forestale esecutiva, sotto il Ministero dell'Agricoltura e dell'Alimentazione, sovrintende le sei regioni gestendone territorio, allevamento e controllo della selvaggina in conformità alle leggi sulla caccia. Concede aree specifiche per 15 anni, come quelle delle associazioni di cacciatori, permettendo recinzioni per l'allevamento e la conservazione di varie specie di selvaggina. Tuttavia i suini EBS, non rientrando nei regolamenti relativi ai territori forestali, richiedono un'approvazione generale dal Ministero dell'Agricoltura e dell'Alimentazione per il loro allevamento.

3. Backyard

Prima della diffusione della PSA, i backyard simboleggiavano un pilastro della tradizione rurale bulgara, rappresentando l'unica fonte di carne per molte famiglie. Tuttavia, l'epidemia ha devastato questo settore. Gli ex allevatori, sebbene teoricamente potrebbero riprendere l'attività, esitano a farlo riportando una mancanza di fiducia nelle autorità e timori di perdite future. Gli indennizzi per l'abbattimento, finanziati dall'UE, sono stati di 300 BNG (circa 150 €) per allevamento, aiutando gli allevatori a compensare parte delle loro perdite e alla disinfezione delle strutture. Nella regione di Shumen, l'Associazione degli allevatori di suini industriali ha contribuito agli indennizzi, riconoscendo che la scomparsa degli allevamenti tradizionali minaccia il patrimonio culturale bulgaro.

2. **Incontri con le autorità bulgare**

Le discussioni con le autorità bulgare, compreso il Ministero dell'Agricoltura e dell'Alimentazione, il BFSA e il Risk Assessment Center on Food Chain, hanno prodotto indicazioni cruciali per preservare la razza EBS e le pratiche agricole tradizionali. Di seguito i punti principali.

1. Pianificazione dell'uso del territorio per l'allevamento dell'EBS, con focus sulla ricerca di aree nell'habitat naturale della razza, garantendo misure di biosicurezza e benessere animale, con la fornitura di spazi adeguati (e.g. libertà di poter manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche)
2. Sostegno finanziario per le recinzioni
3. Deroga del Regolamento n. 10 per consentire agli allevatori di EBS l'uso di macelli come gruppi di produttori, pur non avendo ottenuto ricavi comprovati dalla produzione venduta. In alterativa, si promuove la messa a disposizione di macelli mobili
4. Inclusione dei produttori di carne suina nel Regolamento n. 26 per regolare il commercio diretto dei prodotti primari
5. Implementare un piano di conservazione del patrimonio genetico in situ ed ex situ

Sebbene esistano programmi europei per promuovere lo sviluppo rurale sostenibile e la conservazione delle razze autoctone, l'importanza delle misure di biosicurezza esterne (e.g. recinzioni) non è sempre riconosciuta come incentivo di supporto. Si raccomanda quindi di esplorare nuovi approcci di produzione zootecnica, promuovere iniziative strategiche per la diversità genetica e coordinare gli sforzi dell'UE per armonizzare il controllo della PSA con la conservazione delle razze suine autoctone.

1. **Workshop**

Durante il workshop si sono svolte discussioni tra ricercatori e autorità riguardo all'impatto della PSA, con particolare attenzione agli allevatori di piccola scala. Rappresentanti di Bulgaria, Ungheria, Italia, Serbia, Spagna e Romania hanno presentato casi relativi a razze autoctone (e.g. Basna, Cinta Senese, Mangalica, Mora Romagnola, Cerdo Iberico). In particolare, sono stati illustrati lo stato attuale e le pratiche di prevenzione della PSA. La Spagna, principale produttore di suini dell'UE e reduce dall'epidemia di PSA (1960-1995), ha implementato un solido sistema di biosicurezza, specialmente per gli allevamenti *outdoor*, con particolare attenzione alla separazione dei suini domestici dai cinghiali. L'approccio spagnolo, replicabile e adattabile, evidenzia la possibilità di professionalizzare l'allevamento *outdoor* con standard elevati di biosicurezza. Si raccomanda un approccio che consideri gli aspetti tecnici, socio-economici ed educativi della biosicurezza come un investimento essenziale, supportato da partenariati pubblico-privati. Il confronto tra le varie realtà europee è stato fondamentale per stimolare discussioni su potenziali misure di protezione e per promuovere politiche specifiche e richieste di deroghe all'UE per le misure di controllo della PSA.

2. **Questionari strutturati**

Di seguito, una panoramica dei risultati dei questionari, suddivisi per sezione, raccolti sia durante la missione in campo (n=7), sia online (n=3). Si noti che, poiché solo un questionario appartiene al tipo (ii), questi risultati si riferiscono al questionario destinato agli allevatori.

1. Dati demografici e aziendali

Gli intervistati, in prevalenza di sesso maschile, erano principalmente localizzati (88,8%) nelle regioni designate dal Regolamento n. 6. La maggioranza (66,7%) possedeva allevamenti di suini EBS, con un unico allevamento con suini EBS registrati.

2. Impatto della PSA sugli allevamenti di suini

Gli allevatori di EBS hanno identificato le restrizioni agli spostamenti degli animali come la misura più impattante. Le limitazioni al commercio e le perdite economiche sono state considerate le conseguenze più significative per l'azienda (77,8% e 44,9%, rispettivamente). La maggior parte degli intervistati ha partecipato a corsi di formazione specializzati per la prevenzione della PSA, attraverso sessioni educative condotte dalle autorità veterinarie e materiali di sensibilizzazione. L'87,5% degli intervistati non ha ricevuto sussidi per l'attuazione di misure preventive. Il 66,7% degli allevatori EBS intervistati ha riportato impatti diretti, e solo il 60% delle aziende colpite ha ricevuto sussidi, spesso insufficienti a coprire le perdite subite.

3. Valutazione della percezione della PSA

Il 55,5% degli intervistati individua nel contatto diretto con animali infetti il metodo più efficace per introdurla in un allevamento, mentre una minoranza (22,2%) considera gli insetti come potenziale vettore. La diffusione nel Paese è principalmente attribuita ai cinghiali e agli spostamenti umani.

In base ai dati raccolti con la scala di valutazione relativa alla percezione delle misure preventive, le misure preventive ritenute più efficaci e al tempo stesso applicabili sono: lavare e cambiare abiti e calzature; vietare l'alimentazione con scarti alimentari e quella *outdoor* e garantire la pulizia e disinfezione dell'allevamento. Pur essendo stato giudicato efficace, l'uso di recinzioni è stato considerato difficile da attuare.

DISCUSSIONE

Il presente studio fornisce una visione esaustiva dell'impatto della PSA in Bulgaria sugli EBS, rivelando questioni cruciali e suggerendo azioni mirate per affrontare le sfide attuali.

La presenza di ostacoli finanziari nel riavvio dell'allevamento di EBS e la mancanza di fondi statali per adattarsi alle misure di prevenzione e controllo (e.g. recinzioni) rappresentano una delle maggiori criticità evidenziate. Il supporto economico e gli eventi formativi forniti dalle autorità sono essenziali per rafforzare la loro credibilità e affidabilità come partner nella gestione dell'allevamento agli occhi degli allevatori. Allo stato attuale, la mancanza di aiuti concreti ha portato ad una forte disillusione nei confronti delle autorità con il rischio di aumento di pratiche non consone di allevamento e di mancata notifica della malattia. Il confronto con esperienze europee evidenzia la necessità di politiche personalizzate e deroghe comunitarie per il controllo della PSA, sottolineando l'importanza della preservazione delle razze autoctone.

CONCLUSIONE

La conservazione del patrimonio culturale immateriale (e.g. pratiche alimentari tradizionali) è cruciale per preservare l'identità sociale e promuovere lo sviluppo socio-economico. Tuttavia, le razze suine autoctone in Europa stanno vivendo un declino significativo, principalmente a causa dell'industrializzazione e dei cambiamenti socio-economici, accentuati dalle epidemie come la PSA. Il caso bulgaro degli EBS evidenzia l'importanza di queste razze,

mostrando il loro ruolo multifunzionale nelle sfere culturali e socio-economiche. Gli allevatori affrontano gravi sfide, dalle ripercussioni economiche allo stress emotivo causato dalla perdita di mandrie intere. D'altra parte, mancano indicatori completi per valutare appieno il valore socio-economico e culturale di queste razze, sottolineando la necessità di sviluppare tali strumenti per promuovere l'advocacy e generare un cambiamento significativo. È cruciale salvaguardare le razze autoctone e promuovere sforzi collaborativi per migliorare misure di biosicurezza e pratiche sostenibili di allevamento dei suini. In linea con le politiche dell'UE, come il Green Deal, l'accento sulla sostenibilità sottolinea l'importanza delle razze suine autoctone nel plasmare la produzione di carne per rispettare gli standard ambientali ed etici attuali. È essenziale adottare un approccio sensibile alle culture e alle tradizioni locali nella lotta contro la PSA, poiché questa malattia richiede soluzioni integrate e coordinate.

RINGRAZIAMENTI
Si ringrazia la SIPAS per aver permesso a questo progetto di concretizzarsi, Veterinari Senza Frontiere Italia che ha dato il suo contributo nell'ambito del progetto DEFEND n. 773701, nell'ambito del quale ha collaborato anche il dott. Hannes Bergmann (Friedrich-Loeffler-Institut).

BIBLIOGRAFIA
1. Guberti, V., Khomenko, S., Masiulis, M., and Kerba, S. (2022). African swine fever in wild boar Ecology and biosecurity. Second edition. FAO Animal Production and Health Manual No. 28. https://doi.org/10.4060/cc0785.
2. Dixon, L.K., Stahl, K., Jori, F., Vial, L., and Pfeiffer, Di.U. (2020). African Swine Fever Epidemiology and Control. Annu Rev Anim Biosci *8*, 221–246. 10.1146/ANNUREV-ANIMAL-021419-083741.
3. Sánchez-Cordón, P.J., Montoya, M., Reis, A.L., and Dixon, L.K. (2018). African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. Vet J *233*, 41–48. 10.1016/J.TVJL.2017.12.025.
4. Dixon, L.K., Sun, H., and Roberts, H. (2019). African swine fever. Antiviral Res *165*, 34–41. 10.1016/J.ANTIVIRAL.2019.02.018.
5. Urbano, A.C., and Ferreira, F. (2022). African swine fever control and prevention: an update on vaccine development. Emerg Microbes Infect *11*, 2021. 10.1080/22221751.2022.2108342.
6.
7. Iacolina, L., Penrith, M.-L., Bellini, S., Chenais, E., Jori, F., Montoya, M., Ståhl, K., and Gavier-Widén, D. (2021). Understanding and combatting African Swine Fever: A European perspective. Understanding and combatting African Swine Fever. 10.3920/978-90-8686-910-7.
8. Rolesu, S., Mandas, D., Loi, F., Oggiano, A., Dei Giudici, S., Franzoni, G., Guberti, V., and Cappai, S. (2021). African Swine Fever in Smallholder Sardinian Farms: Last 10 Years of Network Transmission Reconstruction and Analysis. Front Vet Sci *8*, 692448. 10.3389/FVETS.2021.692448/BIBTEX.
9. Nielsen, S.S., Alvarez, J., Bicout, D.J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J.A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J.L., Herskin, M., Miranda Chueca, M.Á., et al. (2021). African swine fever and outdoor farming of pigs. EFSA Journal *19*. 10.2903/J.EFSA.2021.6639.
10. Zani, L., Dietze, K., Dimova, Z., Forth, J.H., Denev, D., Depner, K., and Alexandrov, T. (2019). African Swine Fever in a Bulgarian Backyard Farm—A Case Report. Vet Sci *6*. 10.3390/VETSCI6040094.
11. Ministry of Agriculture and Food (2021). 2020 Annual Report on the State and Development

of Agriculture.
12. Marchev, J., Doneva, R., and Dimitrova, D. (2018). East Balkan swine – autochthonous Bulgarian pig breed. Archivos De Zootecnia.
13. Ivanova-Peneva, S.G., and Stoykov, A. (2005). East Balkan Swine in Bulgaria - an option for organic production. Proceedings of the 4th Sustaining Animal Health and Food Safety in Organic Farming (SAFO) Workshop, 97.
14. Slow Food International East Balkan Swine. https://www.fondazioneslowfood.com/en/slow-food-presidia/east-balkan-swine/.
15. Rede, R., Pribisch, V., and Rahelic, S. (1986). Untersuchungen uber die Beschaffenheit von Scklachttierkorpern und Fleisch primitiver und hochselektierter Schweinerassen. Fleischwirtschaft, 898–907.
16. Essén-Gustavsson, B., Karlsson, A., Lundström, K., and Enfält, A.C. (1994). Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-gene-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. Meat Sci *38*, 269–277. 10.1016/0309-1740(94)90116-3.
17. Suzuki, A., Kojima, N., Ikeuchi, Y., Ikarashi, S., Moriyama, N., Ishizuka, T., and Tokushige, H. (1991). Carcass composition and meat quality of Chinese purebred and European × Chinese crossbred pigs. Meat Sci *29*, 31–41. 10.1016/0309-1740(91)90021-H.
18. Ender, K., Numberg, K., Wegner, J., and Seregi, J. (2002). Fleich und Fett von Mangalitza-Schweinen im Labor . Fleischwirtschaft , 125–128.
19. Doychev, V. (2009). Study of the opportunities of optimization quality and diet of pig meat.
20. Ministry of Agriculture and Food (2024). 2023 Annual Report on the State and Development of Agriculture.
21. Deutscher Jagdverband (2022). Infografik_Jaeger_Europa_2021. https://www.jagdverband.de/sites/default/files/2022-03/2022-01_Infografik_Jaeger_Europa_2021.jpg.
22. Directorate G-Crisis management in food, animals and plants U.G.-O. controls and eradication of diseases in animals (2015). Strategic approach to the management of African Swine Fever for the EU.
23. Executive Forest Agency (2022). Analysis of wild boar utilization for the period 2017-2021.

ISOLAMENTO VIRALE DI PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 GENOTIPO -2E: UN PRIMO TENTATIVO

VIRAL ISOLATION OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2E (PCV-2E): A FIRST ATTEMPT

FAUSTINI G.[1], LLORENS A.M.[2;3;4], SIBILA M. [2;3;4], SEGALÉS J. [2;4;5], FRANZO G. [1]

[1]Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute (MAPS) – Università di Padova; [2]Unitat Mixta d'Investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain; [3]IRTA, Programa de Sanitat Animal, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; [4]WOAH Collaborating Center for Research and Control of Emerging and Re-Emerging Pig Diseases (IRTA-CReSA), 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain; [5]Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, UAB, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

Parole chiave: PCV-2e, isolamento virale, coltura cellulare.
Keywords: PCV-2e, viral isolation, cell culture.

Riassunto
Il Porcine circovirus type 2 (PCV-2) è un patogeno chiave per la suinicoltura mondiale, responsabile di perdite economiche rilevanti. Il controllo del PCV-2 si basa fortemente sulla vaccinazione, la cui efficacia, sebbene provata, è pur sempre messa a dura prova dalla rapida evoluzione di questo virus. Nove genotipi sono emersi negli anni, con un'alta frequenza per i genotipi PCV-2a, PCV-2b e PCV-2d, la cui patogenicità è nota. Al contrario, per i genotipi "minori" la distribuzione, così come la rilevanza clinica, appare limitata. Tra questi ultimi, il PCV-2e è quello più preoccupante, in quanto la sua divergenza rispetto ai genotipi maggiori rappresenta una potenziale minaccia agli attuali programmi diagnostici e vaccinali. Nel 2022, il PCV-2e è stato identificato in diversi allevamenti rurali del Veneto. Lo scopo di questo studio era dunque quello di isolare il ceppo italiano di PCV-2e, per poterne poi studiare dettagliatamente la relativa biologia e fornire una base per lo sviluppo di futuri vaccini. Campioni di tessuto di suini PCV-2e-positivi sono stati sottoposti a tentativi di isolamento virale su linee cellulari PK-15. Nonostante gli sforzi di ottimizzazione, non è stato possibile ottenere un isolamento e una replicazione virale adeguati. Se questo sia legato alla qualità dei campioni iniziali, o alle peculiarità biologiche del ceppo in esame, richiederà ulteriori approfondimenti. Se da un lato questo studio ha evidenziato le difficoltà nell'isolamento del PCV-2e, dall'altro ha fornito indicazioni preziose per futuri tentativi, sottolineando la necessità di fonti di campioni più idonee o la valutazione di altre linee cellulari. Ulteriori sforzi e nuovi campioni si rendono necessari per aumentare le possibilità di isolamento di PCV-2e, per ottenere una quantità adeguata di particelle virali che permettano di studiarne la biologia e rivelarne le caratteristiche genetiche per lo sviluppo di nuovi vaccini.

Abstract
Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is a key pathogen in the global swine industry, causing relevant economic losses. PCV-2 control strongly relies on vaccination, but its rapid evolution

has been posing challenges to vaccine efficacy. Nine genotypes have been emerging over time, with a high-frequency detection of PCV-2a, PCV-2b, and PCV-2d globally in association with the disease, that conflicts with the limited distribution and unclear clinical relevance of other "minor" genotypes. Among the latter, PCV-2e has emerged as a concern due to its divergence, potentially impacting diagnostics and vaccines. In 2022, PCV-2e was identified in multiple rural farms in Veneto region. This study aimed to isolate the Italian PCV-2e strain, a crucial step for understanding its biology and developing vaccines. Tissue samples from PCV-2e-positive pigs were subjected to viral isolation on PK-15 cell lines. Despite optimization efforts, successful isolation and propagation were not achieved, hindering future studies. Whether this was related to the quality of the initial samples, or the biological peculiarities of the strain under investigation, will require further investigation. While this study highlighted the challenges in isolating PCV-2e, it provided valuable insights for future attempts, suggesting the need for more suitable sample sources. Further efforts with refined protocols and new samples are warranted to increase the chances of PCV-2e isolation and to obtain a proper quantity of viral particles to study its biology and reveal its genetic characteristics for the development of new vaccines.

INTRODUZIONE

Il Porcine circovirus type 2 (PCV-2) è uno degli agenti patogeni più rilevanti dell'industria suina a livello globale. Essendo associato a diverse condizioni cliniche e subcliniche, denominate collettivamente porcine circovirus diseases (PCVD), PCV-2 è responsabile di gravi perdite economiche e di costi non trascurabili(Alarcon et al., 2013).

La PCVD è controllata principalmente grazie all'ampio uso di vaccini. Tuttavia, la loro efficacia è minacciata dalla rapida evoluzione del PCV-2, che porta alla frequente comparsa di nuove varianti attraverso processi di mutazione e ricombinazione.
Attualmente sono riconosciuti nove genotipi di PCV-2 (da PCV-2a a -2h) (Franzo & Segalés, 2018; Wang et al., 2020), tra i quali PCV-2d, -2b e -2a sono (nell'ordine) i più persistentemente diffusi e clinicamente rilevanti. Tra i genotipi minori di PCV-2, il PCV-2e è di particolare interesse poiché la sua divergenza genetica e fenotipica potrebbe potenzialmente compromettere l'efficacia degli attuali metodi diagnostici e dei vaccini commerciali(Franzo & Segalés, 2020; Karuppannan & Opriessnig, 2017).

Dopo essere stato precedentemente identificato negli Stati Uniti, in Messico, Giappone, Cina e Corea del Sud, il PCV-2e è stato recentemente rilevato in Europa in un allevamento italiano, in Veneto, in assenza di segni clinici (Davies et al., 2016; Franzo et al., 2022; Harmon et al., 2015; Liu et al., 2018; Park et al., 2020). In una recente indagine epidemiologica condotta nella stessa area geografica dallo stesso gruppo di ricerca, la circolazione del PCV-2e è stata confermata in più allevamenti rurali della provincia di Verona e Vicenza, confermando l'Italia come il primo Paese in Europa in cui questo genotipo è stato finora identificato (Faustini et al., 2023).

L'identificazione di ceppi di PCV-2e in Italia è stata effettuata mediante analisi molecolari e filogenetiche, che rappresentano uno strumento rapido per la diagnosi e la caratterizzazione genetica. Tuttavia, la sola sequenza del genoma non è sufficiente per comprendere le caratteristiche biologiche di questo genotipo, tra cui la virulenza, i meccanismi di replicazione e le reazioni immunologiche che scatena. Al contrario, solo l'isolamento del virus consentirebbe

studi approfonditi sul ciclo replicativo del PCV-2e e sulle peculiarità genetiche, nonché lo sviluppo di futuri vaccini. Con questo obiettivo, il presente studio si è proposto di isolare il ceppo di PCV-2e recentemente identificato in Italia, per ottenere sufficienti particelle virali utili per futuri studi sperimentali e lo sviluppo di vaccini aggiornati.

MATERIALI E METODI

I campioni utilizzati per l'isolamento del ceppo italiano di PCV-2e provenivano da suini allevati in aziende rurali situate in diversi comuni del veronese, regolarmente macellati alla fine del 2021 e nel corso del 2022. I campioni di polmoni e linfonodi sono stati raccolti al macello dai veterinari ufficiali e consegnati al laboratorio di malattie infettive del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università di Padova per le analisi molecolari (real-time PCR, PCR e sequenziamento Sanger), e la caratterizzazione mediante analisi filogenetica. Gli omogenati tissutali di quattro campioni positivi al PCV-2e, con titoli virali elevati, stimati mediante real-time PCR, sono stati spediti ai laboratori del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) dell'Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) per eseguire l'isolamento.

L'isolamento e la propagazione virale sono stati tentati per tutti i campioni consegnati su linee cellulari di rene suino PK-15. Le linee cellulari sono state inoculate con gli omogenati di tessuto e incubate per 3-5 giorni a 37°C. Osservazioni giornaliere delle colture cellulari sono state effettuate con un microscopio ottico per valutarne la potenziale comparsa di cambiamenti morfologici, effetti citopatici (CPE) e altre possibili alterazioni. Per ogni passaggio delle cellule infette, è stato eseguito un saggio di immunoperossidasi su monostrato (IPMA) per rilevare la presenza di PCV-2 all'interno delle cellule attraverso gli anticorpi anti-PCV-2.

I metodi di preparazione dell'omogenato e di inoculazione, il tempo di incubazione, le concentrazioni di cellule e di terreno di coltura erano inizialmente conformi ai protocolli ideati dal CReSA. A seguito degli esperimenti effettuati, diverse modifiche sono state successivamente introdotte, adattando così i protocolli alle osservazioni quotidiane delle cellule e ai risultati sperimentali. Il surnatante delle colture cellulari veniva sottoposto regolarmente ad analisi in real-time PCR, per confermare l'eventuale presenza di PCV-2, e potenzialmente monitorare e quantificare la sua replicazione attraverso ogni passaggio cellulare.

RISULTATI

Dopo diversi tentativi e modifiche al protocollo originale, un numero limitato di cellule ha mostrato una chiara positività all'IPMA. Quest'ultima è stata successivamente confermata in real-time PCR. Tuttavia, questi risultati sperimentali non furono considerati sufficienti a confermare il successo dell'isolamento e della propagazione del PCV-2e. Per ottenere un'efficace replicazione del virus sono stati effettuati ulteriori passaggi in diverse colture cellulari. I successivi IPMA non hanno però evidenziato alcuna chiara positività. Data l'impossibilità di ottenere risultati positivi, lo studio è stato concluso, non riuscendo così ad ottenere sufficienti quantità di particelle virali per futuri studi sperimentali.

DISCUSSIONE

Nonostante la mancata propagazione del virus a seguito dell'identificazione di cellule positive all'IPMA, il presente studio ha permesso di ottimizzare il protocollo laboratoristico

già esistente a matrici non ideali, e ad un genotipo le cui capacità replicative sembrano minori di quelle di genotipi maggiori (e.g. PCV-2d) (Oh et al., 2022). Tuttavia, oltre ad un protocollo che richieda maggiore cautela nella gestione e pre-processazione del campione, è plausibile che le difficoltà incontrate nell'ottenere l'isolamento e la propagazione del virus siano in massima parte dovute a matrici di partenza con un ridotto numero di particelle virali in attiva replicazione, piuttosto che ad una inidoneità del protocollo originario. Le analisi molecolari inizialmente svolte hanno permesso di quantificare il numero di copie di genoma, o suoi frammenti al tempo dell'identificazione (Faustini et al. 2022), ma non permettono di caratterizzare il titolo virale, ossia le particelle realmente infettanti. Se, in aggiunta a ciò, l' apparente minor capacità replicativa di PCV-2e si ripercuota anche a livello di coltura cellulare, richiederà ulteriori studi (Suh et al., 2023). Campioni di sangue positivi a PCV-2e potrebbero rivelarsi più idonei all'isolamento del virus, rispetto a tessuti di organi interni, in quanto il riscontro del genoma nel circolo sanguigno, e quindi in una situazione di attiva viremia, è più probabilmente associato alla presenza di virus in attiva replicazione.

CONCLUSIONI

Questo studio rappresenta il primo tentativo di isolamento del ceppo italiano del genotipo PCV-2e. Gli esperimenti condotti hanno permesso di comprendere le difficoltà relative all'isolamento di un genotipo apparentemente meno virulento di quelli attualmente dominanti. Un nuovo campionamento svolto negli stessi allevamenti in cui PCV-2e è stato individuato è auspicabile, in modo da ottenere nuove matrici su cui procedere con ulteriori studi. Ripercorrere quanto svolto in questo studio, beneficiando dell'esperienza sin qui ottenuta, partendo da campioni più idonei, o dal maggiore titolo virale, aumenterebbe la probabilità di isolare PCV-2e, e di ottenere un quantitativo di particelle virali sufficiente per poter studiare nel dettaglio la biologia di questo nuovo genotipo.

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. *Preventive Veterinary Medicine*, *110*(2), 88–102. https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2013.02.010
2. Davies, B., Wang, X., Dvorak, C. M. T., Marthaler, D., & Murtaugh, M. P. (2016). Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Research*, *217*, 32–37. https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2016.02.010
3. Faustini, G., Tucciarone, C. M., Legnardi, M., Grassi, L., Berto, G., Drigo, M., Cecchinato, M., & Franzo, G. (2023). Into the backyard: Multiple detections of PCV-2e in rural pig farms of Northern Italy. An unexpected ecological niche? *Preventive Veterinary Medicine*, *216*(May), 105943. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105943
4. Franzo, G., & Segalés, J. (2018). Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLOS ONE*, *13*(12), e0208585. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0208585
5. Franzo, G., & Segalés, J. (2020). Porcine Circovirus 2 Genotypes, Immunity and Vaccines: Multiple Genotypes but One Single Serotype. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *9*(12), 1–12. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9121049
6. 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. *The Veterinary Journal*, *279*, 105787. https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2022.105787

7. Harmon, K. M., Gauger, P. C., Zhang, J., Piñeyro, P. E., Dunn, D. D., & Chriswell, A. J. (2015). Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus Type 2 Viruses Detected in Swine from Mexico and the United States. *Genome Announcements*, *3*(6). https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01315-15
8. Karuppannan, A. K., & Opriessnig, T. (2017). Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/V9050099
9. Liu, J., Wei, C., Dai, A., Lin, Z., Fan, K., Fan, J., Liu, J., Luo, M., & Yang, X. (2018). Detection of PCV2e strains in Southeast China. *PeerJ*, *2018*(3), e4476. https://doi.org/10.7717/PEERJ.4476/SUPP-1
10. Oh, T., Cho, H., Suh, J., & Chae, C. (2022). Virulence Comparison of Four Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genotypes (2a, 2b, 2d and 2e) in Pigs Single-Infected with PCV2 and Pigs Dual-Infected with PCV2 and Mycoplasma hyopneumoniae. *Journal of Comparative Pathology*, *199*, 88–98. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2022.09.012
11. Park, K. H., Oh, T., Cho, H., Yang, S., & Chae, C. (2020). The first isolation of porcine circovirus type 2e from a Korean pig. *Archives of Virology*, *165*(12), 2927–2930. https://doi.org/10.1007/S00705-020-04827-9/FIGURES/3
12. Suh, J., Oh, T., & Chae, C. (2023). Virulence comparison of 4 porcine circovirus type 2 (PCV-2) genotypes: 2a, 2b, 2d, and 2e with a single infection and co-infection with PCV-2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Canadian Journal of Veterinary Research*, *87*(1), 41. /pmc/articles/PMC9808848/
13. 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. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(3), 1284–1294. https://doi.org/10.1111/TBED.13467

Aggiungi il ***C. difficile*** e il ***C. perfringens*** tipo A alla tua protezione!

HIPRA

HIPRA ITALIA · Via Enrico Mattei, 25030 Coccaglio (BS) Italia
Tel.: (+39) 030 7241821 · Fax: (+39) 030 7700881 · italia@hipra.com · www.hipra.com

JRS Fibers for Life.

Effetti e benefici nell'alimentazione dei suini

Con le fibre funzionali JRS

BU LIVESTOCK APPLICATIONS

JRS RETTENMAIER ITALIA
Via Brescia, 37/A | 25014 Castenedolo (BS) Italy
030 7870410 | info@jrsitalia.com

www.jrsitalia.com

LA VIA PER UNO SVEZZAMENTO CON UNA GESTIONE SANITARIA INTEGRATA

Soluzioni su misura per incrementare la vostra produttività con la massima protezione

KEMIN®
Compelled by Curiosity™

Scopri come possiamo supportare la tua attività su:
kemin.com/veterinary-solutions

© Kemin Industries, Inc. and its group of companies 2024. All rights reserved. ® ™ Trademarks of Kemin Industries, Inc., U.S.A.
Certain statements, product labeling and claims may differ by geography or as required by government requirements.

LIVISTO

12 Aziende in
9 Paesi che operano con
500 dipendenti in
129 mercati con quasi
100 anni di storia

Il Gruppo **LIVISTO** è attivo nel settore della salute animale, sviluppando e commercializzando prodotti farmaceutici e nutrizionali di alta qualità per animali da reddito e domestici.

TREI S.p.A. è un'azienda farmaceutica italiana fondata nel 1968 con sede a Rio Saliceto (Reggio Emilia) e dal 2014 è entrata a far parte del Gruppo LIVISTO.

Lo stabilimento produttivo di **TREI** è suddiviso in tre aree:

- produzione medicinali veterinari
- produzione medicinali contenenti β-lattamici
- produzione di integratori nutrizionali e mangimi complementari rumino-protetti

I nostri prodotti:

FARMACI

Per animali da reddito e da compagnia

- Medicinali veterinari uso orale
- Premiscele per alimenti medicamentosi
- Medicinali veterinari uso topico e iniettabile
- Linea vaccini
- Medicinali veterinari in compresse

NUTRIZIONE

- Integratori nutrizionali per ruminanti, suini, avicoli e conigli
- Tecnologia di protezione ruminale Biopass®
- Linea latte Livimilk
- Linea blocchi Megalix/ Megastart/Piglyx
- Linea inoculi Silierung

IGIENE

- Linea di disinfettanti e detergenti per allevamenti, attrezzature e macelli
- Linea di prodotti per il controllo degli insetti nocivi negli allevamenti: Mosca...Stop!
- Prodotti dermatologici per animali da compagnia

Industria Italiana Integratori TREI S.p.A.
e-mail: trei@treivet.com - Tel: +39 0522 640711

Along with you

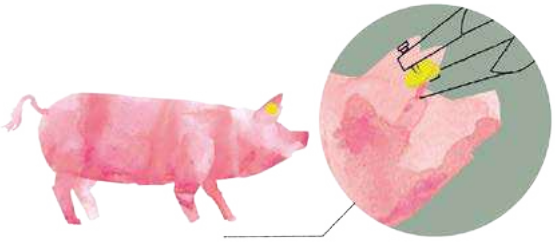
livisto.com

LIVESTOCK PRECISION FARMING

Dalla nascita al consumo il futuro è la tracciabilità individuale dei suini

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.

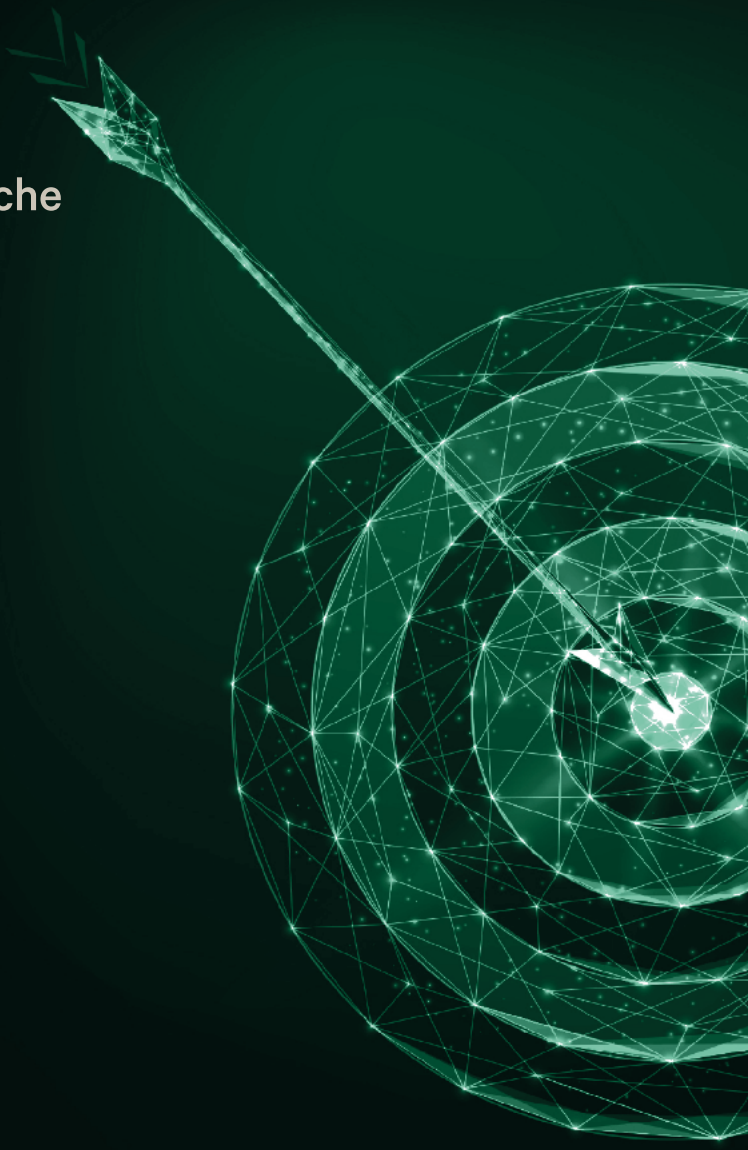


www.leeo.eu
tecnologiasuini@msd.com

LIVESTOCK PRECISION FARMING

MSD Animal Health

La precisione è ciò che
ci rende differenti,
Like no one else



I nostri prodotti sono disegnati
per garantire un rilascio mirato
dei principi attivi lungo il tratto
intestinale degli animali.
Esattamente dove serve.

vetagro.com

VETAGRO®
LIKE NO ONE ELSE®

RISPETTIAMO LA NATURA, **DI OGNI MAIALE.**

ZOETIS SI IMPEGNA AD ACCRESCERE LA SOSTENIBILITÀ
della produzione di carne suina, proponendo soluzioni innovative
per una alimentazione sicura, di qualità e responsabile.

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

zoetis

Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS per il 2024
si svolgono con il contributo non condizionante di

Boehringer Ingelheim

ceva

chemifarma
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Dechra

Dopharma

dox-al

Elanco

LA SALUTE ANIMALE PER LA SALUTE DELL'UOMO
FATRO

HIPRA

KEMIN

LIVISTO
Along with you

MSD
Animal Health

JRS Fibers for Life.

VETAGRO
LIKE NO ONE ELSE

zoetis