

# 51° MEETING ANNUALE

---

**LAZISE (VR) 16/17 APRILE 2026**

TH LAZISE - HOTEL PARCHI DEL GARDA

**VOLUME DEGLI ATTI**



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

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

**2026**

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

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

ISBN 9788894330441

## INDICE

Prefazione .....	p. 18
------------------	-------

### ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

#### INFLUENZA SUINA: EPIDEMIOLOGIA, GESTIONE IN ALLEVAMENTO E IMPLICAZIONI ZONOSICHE

*Parma, 7 Novembre 2025*

CIRCOLANTI FRA I SUINI: AGGIORNAMENTI <i>Chiapponi C.</i> .....	p. 20
OLTRE IL VIRUS: IMMUNOLOGIA E PROSPETTIVE VACCINALI <i>Prosperi A.</i> .....	p. 21
L'INFLUENZA SUINA; CLINICA, DIAGNOSI E CONTROLLO IN ALLEVAMENTO <i>Sandri G.</i> .....	p. 26

### ATTI DEL 51 MEETING ANNUALE

*Lazise (VR), 16-17 Aprile 2026*

FATTORI CHIAVE CHE INFLUENZANO LA LONGEVITÀ DELLE SCROFE: SFIDE E SOLUZIONI <i>Heinonen M.</i> .....	p. 29
STRATEGIE NUTRIZIONALI PER MIGLIORARE LA LONGEVITÀ DELLA SCROFA <i>Bronsvooort B.</i> .....	p. 33
STRATEGIE NUTRIZIONALI PER MIGLIORARE LA LONGEVITÀ DELLA SCROFA GESTIRE I NUOVI MODELLI DI STABULAZIONE DELLE SCROFE <i>Lundsgaard M.</i> .....	p. 35
ANIMALISMO COME NUOVA RELIGIONE <i>Bertaglio A.</i> .....	p. 36
SOSTENIBILITÀ E RUOLO POSITIVO DELLA PRODUZIONE ZOOTECNICA <i>Pascual J.</i> .....	p. 37
DIVARIO GENERAZIONALE: TRA VOCAZIONE E BENESSERE PROFESSIO- NALE, LA SUIATRIA È A UN BIVIO? <i>Scollo A.</i> .....	p. 38

## COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- IMPIEGO DELL'ALTRENOGEST NEL MANAGEMENT DEI RITORNI CICLICI SU SCROFE GESTITE A BANDE PENTASETTIMANALI: STUDI PRELIMINARI  
*Mazzoni C., Tonon F., Stradi L., Catellani G., Scollo A.* ..... p. 41
- VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE IN RELAZIONE AI PROTOCOLLI DI BIOSICUREZZA INTERNA ADOTTATI NELLE PRATICHE VACCINALI NELLA SCROFA  
*Caimmi D., Scollo A., Mazzoni C.*..... p. 53
- VALUTAZIONE DELLE LESIONI DELLA CODA AL MACELLO: AFFIDABILITÀ E VALIDITÀ DI UN PROTOCOLLO DI SCORING MULTI-VIEW SU IMMAGINI DIGITALI  
*D'Alterio R., Baghini S., Luise D., Tiburzi A., Uguzzoni M., Goulunova E., Romano A., Bernabo' N., Marruchella G., Trevisi P., Capobianco Dondona A.* ..... p. 64
- UNA SFIDA INVISIBILE: L'IMPATTO EMOTIVO E PSICOLOGICO DELL'EMERGENZA PSA SUGLI ALLEVATORI  
*Prato Previde E., Galimberti L.*..... p. 69
- DEFINIZIONE DI UNA PROCEDURA OPERATIVA PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO RESIDUO PER ALLEVAMENTI SEDE DI FOCOLAIO DI PESTE SUINA AFRICANA (PSA)  
*Montagnin C., Paladini C., Leo S., Di Silverio M., Hathaway T., Cannistrà M., Galletti G., Iscaro C., Pavone S., Filippini G., Feliziani F.*..... p. 76
- PESTE SUINA AFRICANA: LA SORVEGLIANZA MOLECOLARE COME STRUMENTO DI STUDIO DELLA DIFFUSIONE DELLA MALATTIA E DELLA EVOLUZIONE DEL VIRUS  
*Beato M.S., Iscaro C., Camma' C., Rossi G., Torresi C., Biccheri R., Pirani S., Giammarioli M., Feliziani F.*..... p. 83
- ERADICAZIONE DELLA PRRS IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE MEDIANTE L'UTILIZZO DELLA TECNICA "WEAN & REMOVAL"  
*Sandri G., Bresaola M., Tecli M.E., Ciucci L., Pesente P., Perini F.*..... p. 89
- EXPERT KNOWLEDGE ELICITATION PER UN PERCORSO DIAGNOSTICO APPROPRIATO: FATTORI DI RISCHIO NEL COMPLESSO DELLA SINDROME RESPIRATORIA DEL SUINO  
*Maisano A. M., Scali F., Ossola M., Romeo C.R., Santucci G., Tonni M., Luppi A., Cordioli B., Merenda M., Vio D., Ustulin M., Paniccià M., Piersanti F., Catania S., Alborali G.L.*..... p. 92
- DINAMICHE EPIDEMIOLOGICHE DEL VIRUS DELLA SINDROME RESPIRATORIA E RIPRODUTTIVA DEL SUINO IN ITALIA: IL CONTRIBUTO DEGLI ALLEVAMENTI DI FILIERA E INDIPENDENTI  
*Vio D., Ustulin M., Targhetta C., Zanon C., Ferino L., Faustini G., Franzo G.* ..... p. 102

FATTORI GESTIONALI ASSOCIATI ALLE PERDITE E AL CONSUMO DI ANTIBIOTICI IN SVEZZAMENTO: STUDIO PILOTA SU 34 ALLEVAMENTI MANAGERIAL

*Giacomini E., Masserdotti M., Gaffuri M., Donneschi A., Salvini F.*..... p. 112

DINAMICHE EPIDEMIOLOGICHE E RESISTENZA ANTIMICROBICA EMERGENTE IN STREPTOCOCCUS SUIS NEGLI ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD ITALIA (2021-2025)

*Dilio G., Pepe F., Cucco L., Cornaggia M., Gazzola A., Albini E., Massacci F. R., Sala L., Ventura S., Magistrali C.F.*..... p. 120

APPLICAZIONE DELLA SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IN TRASFORMATI DI FOURIER (FT-IR) PER LA DISCRIMINAZIONE DEI SIEROTIPI DI STREPTOCOCCUS SUIS

*Massacci F.R., Cordovana M., Cucco L., Albini E., Piersanti F., Leo P., Baldaccini A., Luppi A., Vio D., Panicià M., Pezzotti G., Magistrali C.F.*..... p. 131

SALMONELLA TYPHIMURIUM LATTOSIO-POSITIVA DI ORIGINE SUINA: CRITICITÀ DIAGNOSTICHE E DATI GENOMICI

*Dilio G., Magistrali C.F., Gazzola A., Ventura S., Barbieri I., Pongolini S., Scaltriti E., Bracchi C., D'Incau M., Barco L., Losasso C., Salaris S., Cornaggia M.*..... p. 145

SIEROPREVALENZA DI SALMONELLA NEI SUINI PESANTI AL MACELLO: AGGIORNAMENTI E CLASSIFICAZIONE DEL RISCHIO IN ALLEVAMENTI ITALIANI

*Torreggiani C., Pupillo G., Soncini A., D'annunzio G., De Lorenzi G., Benatti D., Guazzetti S., Vio D., Panicià M., Soliani L., Prospero A., Cordioli B., Chiapponi C., Luppi A., Ostanello F.*..... p. 153

OLTRE L'ANTIBIOTICO: VALUTAZIONE IN CAMPO DEI VACCINI STABULOGENI CONTRO MYCOPLASMA HYORHINIS E MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE

*Merenda M., Pratavera D., Morales-Arce A.Y., Picchi M., Maisano A. M., Santucci G., Tonelli C., Ustulin M., Vio D.*..... p. 161

ELEVATA PREVALENZA DI MYCOPLASMA SUIS IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE: STATO EMATOLOGICO ED ASSENZA DI TRASMISSIONE VETTORIALE

*Borello I., Merenda M., Uguzzoni M., Trevisi P., Gobbo F., Garziera T., Soncin M., Bertazzo V., Scollo A.*..... p. 171

MIOCARDITE GRANULOMATOSA ASSOCIATA A INFEZIONE DA PCV2 NEL SUINO

*D'Annunzio G., Cordioli B., De Lorenzi G., Bongiovanni E.*..... p. 181

## POSTER

- SUPPLEMENTAZIONE A BREVE TERMINE CON BETA-1,3-GLUCANO MIGLIORA LA QUALITÀ DEL COLOSTRO IN SCROFE IPERPROLIFICHE  
*Santos T., Soto-Salanova M.F., Casiro S., Mattuzzi S., Roxo A., Joaquim M.*..... p. 189
- VALUTAZIONE DELL'IMMUNOGLOBULINA G DEL COLOSTRO IN UN ALLEVAMENTO COMMERCIALE DI SCROFE: DIFFERENZE IN BASE AL PARTO E RUOLO DEL BETA-1,3-GLUCANO COME IMMUNOADIUVANTE  
*Mattuzzi S., Garrido I.A., Neto R., Casiro S., Kirwan S.*..... p. 191
- POLMONITI GRANULOMATOSE DA CORPI ESTRANEI VEGETALI NEI SUINI AL MACELLO  
*Romano A., Baghini S., Di Benedetto F., Piccioni M.A., Rosamilia A., Ciabattoni U., Olivastri A., Marruchella G.*..... p. 192
- INDAGINE PRELIMINARE SU DIVERSI METODI PER RILEVARE LA PRESENZA DI INFLUENZA A IN ALLEVAMENTI DI SUINI COMMERCIALI  
*Cordioli B., Todeschi M., Canelli E., Arioli E., Soliani L., Torreggiani C., Luppi A., Chiapponi C., Proserpi A.*..... p. 195
- COMPUTER VISION AL MACELLO: CLASSIFICAZIONE DELLE CARCASSE IN BASE AL SESSO  
*D'Angelo M., D'alterio R., Armeni B., Robbe D., Khorashadizadeh M., Capobianco Dondona A., Marruchella G.*..... p. 203
- L'INTRECCIO UOMO-SUINO: L'EMERGENZA DI NUOVI VIRUS INFLUENZALI H3N2 DI ORIGINE UMANA NEL NORD ITALIA  
*Soliani L., Mescoli A., Zanni I., Baioni L., Alborali G., Maisano A., Moreno A., Faccini S., Rosignoli C., De Lorenzi G., Pupillo G., Fiorentini L., Torreggiani C., Cordioli B., Proserpi A., Luppi A., Chiapponi C.*..... p. 208
- CASO CLINICO: RIDUZIONE DELL'INCIDENZA DI TUMEFAZIONI OMBELICALI MEDIANTE GESTIONE ATTIVA DEL CORDONE ALLA NASCITA  
*Favaro D., Moscon E., Tonon F.*..... p. 215
- CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI STREPTOCOCCUS SUIS SIEROTIPO 9 SEQUENCE TYPE 123: RIDOTTA SENSIBILITÀ AI BETA-LATTAMICI IN ITALIA E SPAGNA  
*Massacci F.R., Cucco L., Albini E., Russo E., Piersanti F., Ciuti F., Briscolini S., Dilio G., Paniccià M., Fernandez-Garayzabal J.F., Vela A.I., Pezzotti G., Magistrali C.F.*..... p. 219
- PUNTEGGIATURA DELLE LESIONI POLMONARI AL MACELLO: METODI A CONFRONTO E CONCORDANZA FRA OSSERVATORI  
*Romano A., Baghini A., D'alterio R., Di Benedetto F., Battisti V., Rosamilia A., Capobianco Dondona A., Ciabattoni U., Piccioni M.A., Olivastri A., Marruchella G.*.... p. 246

QUALI PRODOTTI DISINFETTANTI SCEGLIERE PER PROTEGGERSI DALLA PESTE SUINA AFRICANA (PSA)?

*Beato M.S., Pavone S., Montagnin C., Iscaro, C., Feliziani F.* ..... p. 252

EFFETTI DI UN INTEGRATORE NUTRIZIONALE ARRICCHITO DI FERRO SULLA CRESCITA DEI SUINETTI E SULLE PRESTAZIONI NELLO SVEZZAMENTO

*Nuñez Zena C., Van den Borne J., Do Carmo Silva L., Smolders M., Longo A., Coppens H., Martins M., Pereira Braga S., Beccalossi M.*..... p. 256

**PREMIO  
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2026**

EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUZIONE DI PARASSITI DI RILEVANZA VETERINARIA E ZOONOTICA NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI DEL NORD ITALIA

*Allievi C.*..... p. 260

**PREMIO  
FORMAZIONE PROFESSIONALE ITALIA 2025**

VACCINAZIONE LAWSONIA INTRACELLULARIS LAWSONIA INTRACELLULARI VACCINATION

*Salviani A.*..... p. 272

**PREMIO  
FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2025**

QUANTO COSTA LA PED NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO? ANALISI SU DATI DI CAMPO TRAMITE UN ALGORITMO CHE COMBINA UN MODELLO FULL-BUDGET E INFERENZA CAUSALE

*Perrucci A., De Avila H., Linhares D., Holtkamp D., Scollo A., Magalhaes E.S.*..... p. 280



*Il suo benessere  
è nelle tue  
mani*



INGELVAC CIRCOFLEX®

INGELVAC MYCOFLEX®

INGELVAC PRRSFLEX® EU

REPROCYC® PRRS EU

REPROCYC® PARVOFLEX

ENTERICOLIX®

ENTERISOL® ILEITIS

# bio98

Biosuis Rokoklos



Biosuis Salm



Biosuis Mhyo



Parvoerysin

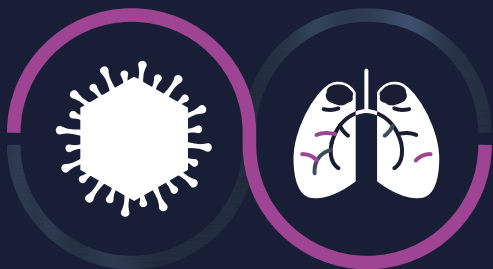


*Allevare è un capolavoro difendiamolo insieme*

**Bio98 srl**

Viale E.Forlanini 15 20134 Milano  
Tel 02 6428299 Mail info@bio98.it

# Prevenzione di PCV2 & M Hyo



## CIRBLOC® MHyO



Protezione rapida e di lunga durata, ideale verso PCV2 e *M.hyo* pneumoniae: 23 settimane post-vaccinazione



Protezione nei confronti dei principali genotipi di PCV2



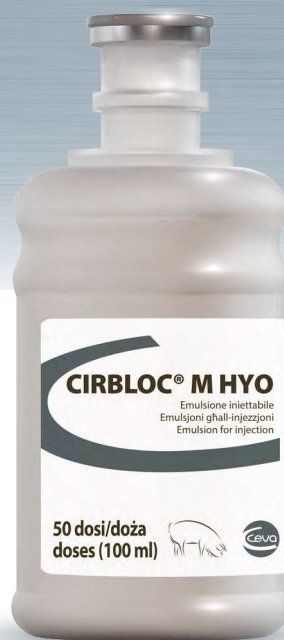
Formulazione basata su Hyogen®

# Quando qualcosa non esiste, la inventi!

## Formulazione RTU



### Unica



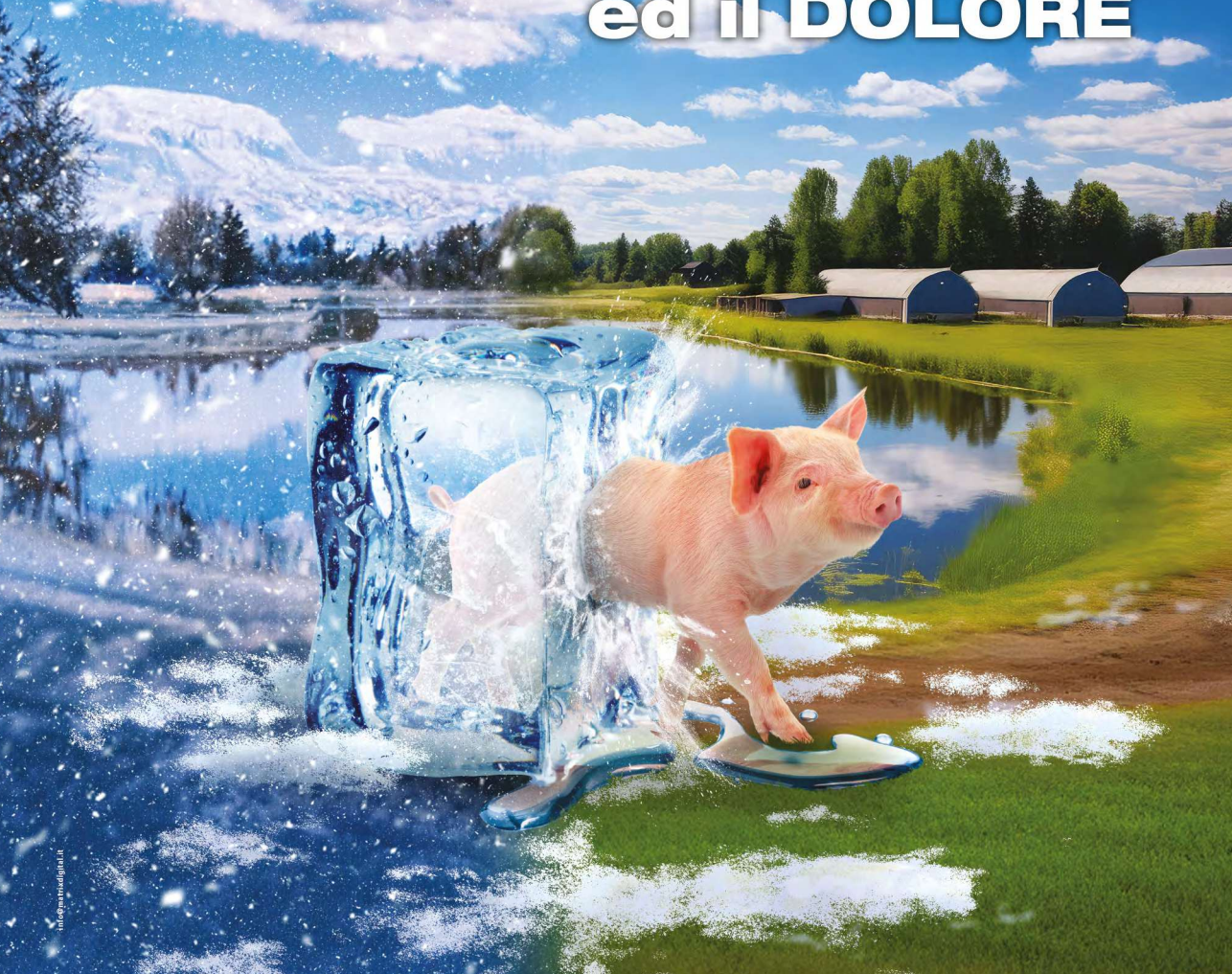
Ceva Salute Animale S.p.A.

Via dei Valtorta 48 - 20127 Milano | e-mail: [marketing.italy@ceva.com](mailto:marketing.italy@ceva.com) | [www.ceva-italia.it](http://www.ceva-italia.it)





# IL NUOVO FARMACO che SCIOGLIE la FEBBRE ed il DOLORE



medipharma.it



PER MAGGIORI INFORMAZIONI CONTATTACI: tel.: 0543 796464 - e-mail: [info@chemifarma.it](mailto:info@chemifarma.it)

**5** *anni*

---

 **Dopharma**  
*Italia*



**Healthy livestock**  
**Healthy food**  
**Healthy people**

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

# LA DIARREA POST SVEZZAMENTO PUÒ ESSERE UN ROMPICAPO. METTIAMO INSIEME TUTTI I PEZZI!



**COLIPROTEC™ F4/F18**  
PER UN FUTURO PIÙ SOSTENIBILE

**OTTIMIZZA L'APPROCCIO MULTIFATTORIALE  
ALLA DIARREA POST SVEZZAMENTO DA E. COLI/ETEC  
E MASSIMIZZA I RISULTATI PER IL TUO ALLEVAMENTO.**

**PROTEGGI I TUOI SUINETTI IN MODO SOSTENIBILE CON COLIPROTEC® F4/F18,  
L'UNICO VACCINO VIVO ORALE CONTRO LA DIARREA POST-SVEZZAMENTO DA E. COLI ETEC.**



**DISPONIBILE NELLA  
CONFEZIONE DA 4X50 DOSI**

**E NELLA NUOVA  
CONFEZIONE DA 200 DOSI**

**COLIPROTEC™ F4/F18**  
PER UN FUTURO PIÙ SOSTENIBILE

Coliprotec® F4/F18: *E. coli* O8:K87 (F4ac) vivo non patogeno non attenuato, *E. coli* O141:K94 (F18ac) vivo non patogeno non attenuato, è un vaccino per l'immunizzazione attiva dei suini nei confronti di *E. coli* F4- e F18-ETEC. Per le informazioni complete sul prodotto consultare il foglio illustrativo presso: <https://www.prontuario veterinario.it>

**Materiale riservato ai Medici Veterinari e agli Allevatori Professionisti.**

**Consultare il proprio Medico Veterinario per le indicazioni sulla prescrizione  
e l'uso corretto del prodotto.**

**Elanco**

Coliprotec®, Elanco e la barra diagonale sono marchi registrati di Elanco o sue affiliate.  
©2024 Elanco. PM-IT-24-0203  
**Elanco Italia S.p.A.**  
Via dei Colatori 12,  
50019 Sesto Fiorentino (FI)

# Fatti "influenzare" dalla lungimiranza



## FLUEN-SUIVAX®

Vaccino inattivato contro l'INFLUENZA dei suini

- Riduce la circolazione del virus influenzale all'interno dell'allevamento
- Riduce la gravità dei sintomi e delle lesioni causate dall'influenza
- Può contribuire a ridurre gli effetti di infezioni concomitanti
- Somministrazione sottocutanea e intramuscolare
- Assenza di istolesività



PER L'USO CONSULTARE IL MEDICO VETERINARIO



FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO)  
Tel. 051 6512711 - [www.fatro.it](http://www.fatro.it) - [info@fatro.it](mailto:info@fatro.it)





**FEEDPRO** si propone come fornitore di **materie prime e additivi** ad alto contenuto tecnologico.

Siamo partner di aziende che investono in ricerca per offrire all'industria mangimistica prodotti innovativi, con l'obiettivo di **migliorare le performance**, il benessere e la **salute animale**, in linea con le aspettative di un mercato in continua evoluzione.

Forniamo:

- **Concentrati proteici di soia** (anche no OGM), proteine vegetali fermentate di colza, soia e alghe, ricche di lattobacilli e acido lattico (**EP100, EP199, EP200**);
- **Fitoterapici e oli essenziali** per supportare il controllo di clostridiosi e della presenza di batteri gram positivi e gram negativi.



## PREFAZIONE

Cari colleghi,

sono lieta di darvi il benvenuto, a nome di tutto il Consiglio Direttivo, al 51° Meeting Annuale della SIPAS.

Il Meeting Annuale rappresenta un appuntamento fondamentale nella vita della Società, in quanto consente di “promuovere, coordinare studi, attuare azioni di educazione permanente, ricerche, dibattiti, scambi di idee e di informazioni su quanto si riferisce alla suinicoltura”, così come stabilito dal nostro Statuto. Fin dalla sua fondazione, l’anima della SIPAS è stata profondamente legata alla diffusione e alla promozione della cultura scientifica e della ricerca applicata, sempre con l’obiettivo di renderle fruibili per tutta la filiera.

Questo scambio di idee e di informazioni è assicurato non solo dalla qualità dei relatori invitati, ma anche, e soprattutto, dai contributi scientifici, dalla loro condivisione e dalla discussione in sede congressuale.

In questo senso, la composizione della Società, che riunisce le diverse anime della suinicoltura – dall’allevamento alla veterinaria privata, pubblica e accademica – garantisce l’adozione di molteplici punti di vista nella valutazione dei lavori, favorendo un arricchimento reciproco e una continua crescita del livello scientifico. Appare quindi fondamentale, per garantire il buon funzionamento della SIPAS, preservarne la pluralità e l’inclusività, a partire dai soci, passando per gli autori dei lavori scientifici e i relatori, fino al Consiglio Direttivo.

Auspichiamo che il volume degli Atti SIPAS continui a essere uno strumento di consultazione utile per ricercatori e operatori del settore. Per questo motivo, abbiamo mantenuto il formato dei lavori che, pur essendo impegnativo in fase di redazione, consente di garantire informazioni dettagliate e complete. La pubblicazione del volume degli Atti, che comprende anche i contributi dei partecipanti ai premi, rappresenta dunque un traguardo per la nostra Società ed è patrimonio di tutti i soci.

Per il 2026 abbiamo ricevuto contributi su tematiche molto diverse: dalle più consuete, come sanità, alimentazione e gestione, a quelle meno tradizionali, ma non per questo meno rilevanti, legate ad aspetti etici e sociali. Anche per il 2026, il numero e la qualità dei contributi risultano più che soddisfacenti e, per questo, desideriamo esprimere il nostro più vivo ringraziamento agli autori.

Ricerca, formazione degli operatori e crescita professionale dei giovani colleghi sono obiettivi che la SIPAS ha perseguito negli anni con costanza e che continuerà a promuovere anche in futuro.

Desidero, a nome del Consiglio, ringraziare le Aziende sponsor della SIPAS per il 2026, il cui sostegno nel tempo rappresenta una garanzia di continuità per la Società e una testimonianza di reciproca soddisfazione per le attività svolte.

Ai relatori di questo e dei prossimi eventi programmati per il 2026 va la riconoscenza e il ringraziamento di tutta la Società per la disponibilità dimostrata e per la qualità delle informazioni che certamente offriranno.

Infine, desidero ringraziare i colleghi e amici del Consiglio Direttivo che, in questo primo anno di mandato, non hanno risparmiato le proprie energie nel sostenere le attività della Società. Un doveroso ringraziamento va anche alla Segreteria Delegata, MV Congressi, per il prezioso lavoro svolto.

Lodi, 30 marzo 2026

La presidente SIPAS  
Chiara F. Magistrali

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**INFLUENZA SUINA:  
EPIDEMIOLOGIA, GESTIONE IN ALLEVAMENTO  
E IMPLICAZIONI ZONOSICHE**

*Parma, 7 Novembre 2025*

## **EPIDEMIOLOGIA DEI VIRUS INFLUENZALI DI TIPO A CIRCOLANTI FRA I SUINI: AGGIORNAMENTI**

CHIAPPONI C.

I virus dell'influenza A nei suini (IAV-S) causano una malattia respiratoria altamente contagiosa che può comportare perdite economiche. La sua gestione è complessa a causa della grande variabilità genetica e antigenica dei virus H1 e H3.

I virus IAV-S sono di interesse scientifico, in ottica One Health, per la potenziale minaccia alla salute animale e alla salute pubblica, a causa del loro potenziale zoonotico. Lo studio genetico si concentra sulla circolazione, sull'evoluzione e sulla caratterizzazione dei virus influenzali nei suini, con l'obiettivo di migliorare la sorveglianza e le strategie di controllo.

Gli studi recenti condotti in Europa e in Italia hanno analizzato la diversità genetica e antigenica dei virus H1 e H3 dell'influenza A circolanti tra i suini europei, con l'obiettivo di valutare il rischio zoonotico e l'efficacia delle attuali strategie vaccinali e diagnostiche.

I risultati mostrano che i virus H1 si suddividono in tre principali lineaggi: 1A (derivato dalla pandemia H1N1 del 2009), 1B (origine umana stagionale) e 1C (origine aviaria eurasiatica), con una co-circolazione diffusa e una notevole diversificazione genetica, in particolare nei lineaggi genetici 1C.2.4 e 1C.2.5. I virus H3, sebbene meno frequenti, mostrano anch'essi una diversità significativa, derivante da spillover umani.

Attraverso analisi filogenetiche, test sierologici (HI) e cartografia antigenica, è emerso che molti ceppi virali suini sono antigenicamente distanti sia dai ceppi vaccinali attualmente utilizzati nei suini sia dai virus candidati per la preparazione pandemica (CVV). Inoltre, test su sieri umani (post-infezione e post-vaccinazione) hanno rivelato una limitata immunità crociata nei confronti di diversi ceppi suini, in particolare quelli del lineaggio 1C, suggerendo un rischio aumentato di trasmissione all'uomo e un potenziale pandemico. Questa variabilità ha ripercussioni sulla capacità di rilevazione dei test diagnostici, in particolare sierologici, che richiedono un'accurata selezione e un aggiornamento costanti.

La complessità antigenica osservata, unita alla mancanza di aggiornamenti regolari dei vaccini suini, evidenzia la necessità e l'importanza di una sorveglianza continua e di strategie vaccinali più dinamiche.

# OLTRE IL VIRUS: IMMUNOLOGIA E PROSPETTIVE VACCINALI

PROSPERI A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
"Bruno Ubertini" - Sede Territoriale di Parma*

Il virus dell'Influenza A nel suino (SwIAV) causa una patologia respiratoria endemica, con possibilità di con focolai epidemici. Il virus nel suino è presente classicamente nei sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2, con tuttavia una notevole diversità genetica e antigenica, che comporta l'esistenza di una moltitudine di genotipi differenti. Questa dinamica evolutiva è esacerbata dalle frequenti introduzioni di IAV da altre specie (aviari e uomo) ed è dovuta al ruolo cruciale svolto dal suino come "*mixing vessel*" per il riassortimento e la generazione di nuovi ceppi virali. L'impatto economico della circolazione di IAV nella popolazione suina è rilevante, causando alta morbilità, perdita di peso e predisposizione a infezioni respiratorie secondarie. La vaccinazione non è solo uno strumento primario per ridurre le perdite economiche e la gravità clinica della malattia, ma è anche da considerarsi di primaria importanza per la tutela della salute pubblica. Ridurre la circolazione virale nei suini, infatti, è essenziale per mitigare il rischio di eventi zoonotici e prevenire di conseguenza l'emergenza di virus con potenziale pandemico, come dimostrato dall'origine del virus H1N1 del 2009 (H1N1pdm2009).

La protezione efficace contro il virus dell'Influenza A (IAV) nel suino si basa su una complessa interazione tra risposte immunitarie innate e adattative. L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa, cruciale nelle fasi iniziali dell'infezione. Essa mira a controllare la replicazione virale precoce tramite cellule come le Natural Killer (NK), i macrofagi alveolari e le cellule dendritiche. L'infezione da IAV induce rapidamente (entro 12-24 ore post-inoculazione) la produzione di citochine pro-infiammatorie e antivirali. Nel contempo la risposta umorale è diretta principalmente contro le glicoproteine di superficie, ovvero l'Emoagglutina (HA) e la Neuraminidasi (NA). Gli anticorpi verso l'antigene HA sono i principali mediatori della neutralizzazione virale, bloccando l'ingresso del virus nelle cellule ospiti. Il saggio di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) è la metodica "*gold standard*" per misurare questi anticorpi, che correlano con la protezione clinica, sebbene solo in presenza di una correlazione antigenica stretta (virus omologo) tra ceppi circolanti. Gli anticorpi anti-NA invece inibiscono l'attività sialidasi della NA, prevenendo il rilascio di nuove particelle virali e limitando la diffusione e l'escrezione del virus nelle vie aeree.

Infine, l'immunità cellulo-mediata, che coinvolge i linfociti T, è fondamentale per la risoluzione dell'infezione e la *clearance* virale. L'immunità mediata dai linfociti (T CD4+ *helper* e CD8+ citotossici) è rivolta verso gli epitopi presenti su proteine interne virali più conservate, come la Nucleoproteina (NP) e la Proteina Matrix 1 (M1). Ciò fa sì che questo tipo di immunità svolga un ruolo essenziale per fornire una protezione crociata più ampia (eterologa o eterosubtipica) rispetto agli anticorpi neutralizzanti che mirano all'HA, antigene in continua evoluzione.

Nel suino sono stati proposti diversi vaccini, sviluppati con tecnologie differenti:

- Vaccini adjuvati con Virus Inattivato Intero (WIV): sono i vaccini prevalentemente prodotti e commercialmente disponibili nel suino. Questi vaccini inducono principalmente una risposta sistemica IgG, con titoli HI elevati, ma inducono

risposte T cellulari moderate. Conferiscono di conseguenza protezione adeguata solo contro ceppi omologhi o antigenicamente molto simili. La protezione contro i ceppi eterologhi è spesso parziale o insufficiente.

- Vaccini Vivi Attenuati (LAIV): sono vaccini non ancora ampiamente concessi in licenza per i suini, ma rappresentano un approccio molto promettente. Sono tipicamente somministrati per via intranasale (IN), imitando l'infezione naturale: inducono immunità umorale locale, con presenza di IgA e IgG mucosali nelle vie aeree superiori dal ruolo cruciale nelle dinamiche di infezione. Conferiscono protezione crociata superiore e più ampia (*cross-protection*) rispetto ai WIV contro ceppi eterologhi o eterosubtipici. L'immunità cellulare indotta da LAIV è un fattore probabile nella protezione crociata. Dal punto di vista diagnostico, i LAIV non inducono titoli HI sierici robusti (spesso sono bassi o non rilevabili). Ciò rende i test sierologici HI standard non idonei per prevedere la loro efficacia. I saggi di neutralizzazione sierica (VN) e la misurazione dell'immunità cellulo-mediata (ad esempio di IFN- $\gamma$ ) sono strumenti diagnostici più promettenti per valutare la loro efficacia.
- Piattaforme Vaccinali Sperimentali e Nuove Generazioni: negli ultimi anni a livello globale diverse piattaforme e nuove tecnologie vaccinali sono state studiate, come ad esempio Vaccini a Particelle di Repliconi (RP) in vettori Alphavirus; Vaccini ricombinanti in vettore adenovirale; Vaccini a DNA.

Per concludere, l'enorme diversità antigenica degli SwIAVs circolanti nella popolazione suina e la continua reintroduzione di virus umani nei suini, richiedono strategie vaccinali innovative. Per contrastare la continua evoluzione del virus, la ricerca in merito alle strategie vaccinali future si concentra su nuovi LAIV e su strategie di *prime-boost* eterologo, per ottimizzare l'ampiezza e la qualità della risposta immunitaria. Inoltre, considerando il ruolo di "*mixing vessel*" svolto dal suino e quanto già accaduto con l'emergenza del virus H1N1pdm2009, una vaccinazione efficace nei suini, in grado di ridurre la replicazione e lo *shedding* virale, è quindi da considerarsi imperativa per la tutela della salute pubblica. Infine, la sorveglianza dei virus IAV nel suino è fondamentale per mitigare il rischio di eventi zoonotici e l'emergere di virus con la capacità epidemiche per il suino.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dias AS, Baker ALV, Baker RB, Zhang J, Zeller MA, Kitikoon P, Gauger PC. Detection and Characterization of Influenza A Virus Endemic Circulation in Suckling and Nursery Pigs Originating from Vaccinated Farms in the Same Production System. *Viruses*. 2024 Apr 18;16(4):626. doi: 10.3390/v16040626. PMID: 38675967; PMCID: PMC11054297.
2. Gauger PC, Loving CL, Khurana S, Lorusso A, Perez DR, Kehrli ME Jr, Roth JA, Golding H, Vincent AL. Live attenuated influenza A virus vaccine protects against A(H1N1)pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease. *Virology*. 2014 Dec;471-473:93-104. doi: 10.1016/j.virol.2014.10.003. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25461535.
3. Souza CK, Rajão DS, Loving CL, Gauger PC, Pérez DR, Vincent AL. Age at Vaccination and Timing of Infection Do Not Alter Vaccine-Associated Enhanced Respiratory Disease in Influenza A Virus-Infected Pigs. *Clin Vaccine Immunol*. 2016 Jun 6;23(6):470-482. doi: 10.1128/CVI.00563-15. PMID: 27030585; PMCID: PMC4895012.
4. Abente EJ, Santos J, Lewis NS, Gauger PC, Stratton J, Skepner E, Anderson TK, Rajao DS, Perez DR, Vincent AL. The Molecular Determinants of Antibody Recognition and Antigenic Drift in the H3 Hemagglutinin of Swine Influenza A Virus. *J Virol*. 2016

- Aug 26;90(18):8266-80. doi: 10.1128/JVI.01002-16. PMID: 27384658; PMCID: PMC5008105.
5. Loving CL, Brockmeier SL, Vincent AL, Gauger PC, Zanella EL, Lager KM, Kehrli ME Jr. Cross-fostering to prevent maternal cell transfer did not prevent vaccine-associated enhanced respiratory disease that occurred following heterologous influenza challenge of pigs vaccinated in the presence of maternal immunity. *Viral Immunol.* 2014 Sep;27(7):334-42. doi: 10.1089/vim.2014.0034. Epub 2014 Jun 30. PMID: 24978861.
  6. Gorres JP, Lager KM, Kong WP, Royals M, Todd JP, Vincent AL, Wei CJ, Loving CL, Zanella EL, Janke B, Kehrli ME Jr, Nabel GJ, Rao SS. DNA vaccination elicits protective immune responses against pandemic and classic swine influenza viruses in pigs. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Nov;18(11):1987-95. doi: 10.1128/CVI.05171-11. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21918118; PMCID: PMC3209026.
  7. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Richt JA, Janke BH, Sandbulte MR, Gauger PC, Loving CL, Webby RJ, García-Sastre A. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *J Virol.* 2012 Oct;86(19):10597-605. doi: 10.1128/JVI.01439-12. Epub 2012 Jul 18. PMID: 22811541; PMCID: PMC3457301.
  8. Anderson TK, Nelson MI, Kitikoon P, Swenson SL, Korshlund JA, Vincent AL. Population dynamics of cocirculating swine influenza A viruses in the United States from 2009 to 2012. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013 Dec;7 Suppl 4(Suppl 4):42-51. doi: 10.1111/irv.12193. PMID: 24224819; PMCID: PMC5655888.
  9. Kaplan BS, Souza CK, Gauger PC, Stauff CB, Robert Coleman J, Mueller S, Vincent AL. Vaccination of pigs with a codon-pair bias de-optimized live attenuated influenza vaccine protects from homologous challenge. *Vaccine.* 2018 Feb 14;36(8):1101-1107. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.01.027. PMID: 29366707.
  10. Kitikoon P, Vincent AL, Janke BH, Erickson B, Strait EL, Yu S, Gramer MR, Thacker EL. Swine influenza matrix 2 (M2) protein contributes to protection against infection with different H1 swine influenza virus (SIV) isolates. *Vaccine.* 2009 Dec 11;28(2):523-31. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.130. Epub 2009 Nov 3. PMID: 19837089.
  11. Souza CK, Rajão DS, Sandbulte MR, Lopes S, Lewis NS, Loving CL, Gauger PC, Vincent AL. The type of adjuvant in whole inactivated influenza A virus vaccines impacts vaccine-associated enhanced respiratory disease. *Vaccine.* 2018 Oct 1;36(41):6103-6110. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.08.072. Epub 2018 Sep 1. PMID: 30181048.
  12. Abente EJ, Rajao DS, Gauger PC, Vincent AL. Alphavirus-vectored hemagglutinin subunit vaccine provides partial protection against heterologous challenge in pigs. *Vaccine.* 2019 Mar 7;37(11):1533-1539. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.071. Epub 2019 Feb 2. PMID: 30723064; PMCID: PMC6990457.
  13. Pena L, Vincent AL, Ye J, Ciacci-Zanella JR, Angel M, Lorusso A, Gauger PC, Janke BH, Loving CL, Perez DR. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J Virol.* 2011 Jan;85(1):456-69. doi: 10.1128/JVI.01503-10. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20962084; PMCID: PMC3014183.
  14. Abente EJ, Rajao DS, Santos J, Kaplan BS, Nicholson TL, Brockmeier SL, Gauger PC, Perez DR, Vincent AL. Comparison of Adjuvanted-Whole Inactivated Virus and Live-Attenuated Virus Vaccines against Challenge with Contemporary, Antigenically Distinct H3N2 Influenza A Viruses. *J Virol.* 2018 Oct 29;92(22):e01323-18. doi: 10.1128/JVI.01323-18. PMID: 30185589; PMCID: PMC6206469.
  15. Moraes DCA, Zeller MA, Thomas MN, Anderson TK, Linhares DCL, Baker AL, Silva GS, Gauger PC. Influenza A Virus Detection at the Human-Swine Interface in US Midwest

- Swine Farms. *Viruses*. 2024 Dec 15;16(12):1921. doi: 10.3390/v16121921. PMID: 39772228; PMCID: PMC11680338.
16. Thomas MN, Janzen GM, Markin A, Sharma A, Hewitt K, Li G, Baker AL, Gauger PC, Anderson TK. Active surveillance for influenza A virus in swine reveals within-farm reassortment and cocirculation of distinct subtypes and genetic clades. *Vet Microbiol*. 2025 Oct;309:110681. doi: 10.1016/j.vetmic.2025.110681. Epub 2025 Aug 11. PMID: 40818301; PMCID: PMC12380368.
  17. Olson ZF, Sandbulte MR, Souza CK, Perez DR, Vincent AL, Loving CL. Factors affecting induction of peripheral IFN- $\gamma$  recall response to influenza A virus vaccination in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2017 Mar;185:57-65. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.01.009. Epub 2017 Feb 5. PMID: 28242003.
  18. Vincent AL, Lager KM, Faaberg KS, Harland M, Zanella EL, Ciacci-Zanella JR, Kehrli ME Jr, Janke BH, Klimov A. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. *Influenza Other Respir Viruses*. 2010 Mar;4(2):53-60. doi: 10.1111/j.1750-2659.2009.00121.x. PMID: 20167045; PMCID: PMC5779285.
  19. Hughes HR, Vincent AL, Brockmeier SL, Gauger PC, Pena L, Santos J, Braucher DR, Perez DR, Loving CL. Oral Fluids as a Live-Animal Sample Source for Evaluating Cross-Reactivity and Cross-Protection following Intranasal Influenza A Virus Vaccination in Pigs. *Clin Vaccine Immunol*. 2015 Oct;22(10):1109-20. doi: 10.1128/CFI.00358-15. Epub 2015 Aug 19. PMID: 26291090; PMCID: PMC4580739.
  20. Rajao DS, Sandbulte MR, Gauger PC, Kitikoon P, Platt R, Roth JA, Perez DR, Loving CL, Vincent AL. Heterologous challenge in the presence of maternally-derived antibodies results in vaccine-associated enhanced respiratory disease in weaned piglets. *Virology*. 2016 Apr;491:79-88. doi: 10.1016/j.virol.2016.01.015. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26874588; PMCID: PMC4825855.
  21. Kappes MA, Sandbulte MR, Platt R, Wang C, Lager KM, Henningson JN, Lorusso A, Vincent AL, Loving CL, Roth JA, Kehrli ME Jr. Vaccination with NS1-truncated H3N2 swine influenza virus primes T cells and confers cross-protection against an H1N1 heterosubtypic challenge in pigs. *Vaccine*. 2012 Jan 5;30(2):280-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.10.098. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22067263.
  22. Gauger PC, Loving CL, Lager KM, Janke BH, Kehrli ME Jr, Roth JA, Vincent AL. Vaccine-associated enhanced respiratory disease does not interfere with the adaptive immune response following challenge with pandemic A/H1N1 2009. *Viral Immunol*. 2013 Oct;26(5):314-21. doi: 10.1089/vim.2013.0018. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24033080.
  23. Braucher DR, Henningson JN, Loving CL, Vincent AL, Kim E, Steitz J, Gambotto AA, Kehrli ME Jr. Intranasal vaccination with replication-defective adenovirus type 5 encoding influenza virus hemagglutinin elicits protective immunity to homologous challenge and partial protection to heterologous challenge in pigs. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Nov;19(11):1722-9. doi: 10.1128/CFI.00315-12. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22933397; PMCID: PMC3491537.
  24. Loving CL, Lager KM, Vincent AL, Brockmeier SL, Gauger PC, Anderson TK, Kitikoon P, Perez DR, Kehrli ME Jr. Efficacy in pigs of inactivated and live attenuated influenza virus vaccines against infection and transmission of an emerging H3N2 similar to the 2011-2012 H3N2v. *J Virol*. 2013 Sep;87(17):9895-903. doi: 10.1128/JVI.01038-13. Epub 2013 Jul 3. PMID: 23824815; PMCID: PMC3754103.
  25. Sandbulte MR, Platt R, Roth JA, Henningson JN, Gibson KA, Rajão DS, Loving CL, Vincent AL. Divergent immune responses and disease outcomes in piglets immunized with inactivated and attenuated H3N2 swine influenza vaccines in the presence of

- maternally-derived antibodies. *Virology*. 2014 Sep;464-465:45-54. doi: 10.1016/j.virol.2014.06.027. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25043588.
26. Sandbulte MR, Gauger PC, Kitikoon P, Chen H, Perez DR, Roth JA, Vincent AL. Neuraminidase inhibiting antibody responses in pigs differ between influenza A virus N2 lineages and by vaccine type. *Vaccine*. 2016 Jul 19;34(33):3773-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.06.001. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27325350.
  27. Rajão DS, Chen H, Perez DR, Sandbulte MR, Gauger PC, Loving CL, Shanks GD, Vincent A. Vaccine-associated enhanced respiratory disease is influenced by haemagglutinin and neuraminidase in whole inactivated influenza virus vaccines. *J Gen Virol*. 2016 Jul;97(7):1489-1499. doi: 10.1099/jgv.0.000468. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27031847.
  28. Khurana S, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Gauger PC, Henningson J, Vincent AL, Golding H. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease. *Sci Transl Med*. 2013 Aug 28;5(200):200ra114. doi: 10.1126/scitranslmed.3006366. PMID: 23986398.
  29. Van Reeth K. The post-2009 influenza pandemic era: time to revisit antibody immunodominance. *J Clin Invest*. 2018 Nov 1;128(11):4751-4754. doi: 10.1172/JCI124151. Epub 2018 Oct 8. PMID: 30295644; PMCID: PMC6205375.
  30. Charley B, Riffault S, Van Reeth K. Porcine innate and adaptative immune responses to influenza and coronavirus infections. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1081(1):130-6. doi: 10.1196/annals.1373.014. PMID: 17135502; PMCID: PMC7168046.
  31. Van Reeth K, Parys A, Gracia JCM, Trus I, Chiers K, Meade P, Liu S, Palese P, Krammer F, Vandoorn E. Sequential vaccinations with divergent H1N1 influenza virus strains induce multi-H1 clade neutralizing antibodies in swine. *Nat Commun*. 2023 Nov 27;14(1):7745. doi: 10.1038/s41467-023-43339-3. PMID: 38008801; PMCID: PMC10679120.
  32. Van Reeth K, Ma W. Swine influenza virus vaccines: to change or not to change-that's the question. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;370:173-200. doi: 10.1007/82\_2012\_266. PMID: 22976350.
  33. Van Reeth K, Gracia JCM, Trus I, Sys L, Claes G, Versnaeyen H, Cox E, Krammer F, Qiu Y. Heterologous prime-boost vaccination with H3N2 influenza viruses of swine favors cross-clade antibody responses and protection. *NPJ Vaccines*. 2017;2:11. doi: 10.1038/s41541-017-0012-x. Epub 2017 Apr 20. PMID: 29250437; PMCID: PMC5604745.
  34. De Vleeschauwer A, Qiu Y, Van Reeth K. Vaccination-challenge studies with a Port Chalmers/73 (H3N2)-based swine influenza virus vaccine: Reflections on vaccine strain updates and on the vaccine potency test. *Vaccine*. 2015 May 11;33(20):2360-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.031. Epub 2015 Mar 21. PMID: 25804707.
  35. Parys A, Vandoorn E, Chiers K, Van Reeth K. Alternating 3 different influenza vaccines for swine in Europe for a broader antibody response and protection. *Vet Res*. 2022 Jun 15;53(1):44. doi: 10.1186/s13567-022-01060-x. PMID: 35705993; PMCID: PMC9202218.
  36. Parys A, Vandoorn E, Chiers K, Passvogel K, Fuchs W, Mettenleiter TC, Van Reeth K. Exploring Prime-Boost Vaccination Regimens with Different H1N1 Swine Influenza A Virus Strains and Vaccine Platforms. *Vaccines (Basel)*. 2022 Oct 29;10(11):1826. doi: 10.3390/vaccines10111826. PMID: 36366335; PMCID: PMC9699596.
  37. Vandoorn E, Parys A, Chepkwony S, Chiers K, Van Reeth K. Efficacy of the NS1-truncated live attenuated influenza virus vaccine for swine against infection with viruses of major North American and European H3N2 lineages. *Vaccine*. 2022 Apr 26;40(19):2723-2732. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.03.051. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35367071.

# L'INFLUENZA SUINA; CLINICA, DIAGNOSI E CONTROLLO IN ALLEVAMENTO

SANDRI G.

*Medico veterinario L.P.*

Il virus dell' Influenza del suino (SIV) è un patogeno respiratorio primario del suino che induce lesioni polmonari tipiche.

In Europa e in Italia circolano tutti i 3(4) «sottotipi» con differenti prevalenze.

H1N1 Eurasian “avian like” (EA H1avN1)

H1N1pdm09

H3N2 Reassortant “human like”

H1N2 “human-avian reassortant”

Dal punto di vista clinico possiamo distinguere due tipologie di Influenza Suina:

- Forma Epizootica

Colpisce animali adulti di varie età con inizio improvviso ed acuto. Gli animali colpiti mostrano grande prostrazione, febbre, anoressia, tosse secca e scolo nasale.

- Forma Enzootica

Colpisce di solito animali giovani come ad esempio suinetti svezzati di 3-10 settimane di vita. L'insorgenza e le manifestazioni cliniche sono grandemente influenzate dalla dinamica dell'immunità di popolazione.

Le manifestazioni cliniche dell' Influenza Suina per come si manifestano clinicamente in allevamento sono il risultato della “interazione” di tre fattori: il primo di questi è la “patogenicità intrinseca” del ceppo in questione ovvero la capacità di provocare danno a livello polmonare. Il secondo è il livello di immunità eventualmente presente nei confronti del ceppo specifico in questione mentre in terzo fattore è rappresentato dalla eventuale iperreattività del sistema immunitario del suino in risposta all'infezione. In particolare ci riferiamo alla cosiddetta “Cytokine Storm” - in particolare Interleukina 6 (IL-6) e il TNFalfa – causata dalle cellule T-cell e/o natural killer (NK). Dal monitoraggio ultra ventennale degli episodi influenzali in una importante filiera di produzione suina in Italia si evidenzia chiaramente un andamento stagionale dell' Influenza con manifestazioni prevalenti durante la stagione autunno-inverno ma è importante notare come si siano registrati episodi influenzali anche durante la stagione estiva. Abbiamo visto che possono essere interessati animali di ogni età e stato produttivo, dai giovani suini appena svezzati agli animali adulti come le scrofe.

Per quanto riguarda la diagnosi dell'Influenza suina oltre alla tipica sintomatologia clinica con insorgenza acuta, febbre elevata e tosse per avere conferma bisogna ricorrere all'aiuto del Laboratorio conferendo materiale idoneo (polmoni in caso di mortalità dei soggetti interessati oppure tamponi nasali o fluidi orali). Il Laboratorio in oggetto – di proprietà e gestito dalla Filiera considerata – esegue inizialmente un test immunoenzimatico rapido che può dare una prima risposta (pos/neg) in meno di 24 ore. In seguito viene eseguita una PCR specifica che conferma eventualmente la presenza di Flu e, nella maggior parte dei casi, identifica il sottotipo.

Sempre nell'ambito di questo monitoraggio sono stati tipizzati/definiti i sottotipi e questo ha consentito di definire un andamento nel tempo delle prevalenze. Dati che mostrano come i sottotipi H3N2 e H1N1abbiano mostrato un netto calo della prevalenza nel ventennio osservato mentre contemporaneamente si registrava un aumento del sottotipo H1N2. Pochi in percentuale gli isolamenti di H1N1 pandemico che comunque ha registrato diversi casi a partire dagli anni 2018-19 in avanti.

Per quanto riguarda la terapia il primo approccio prevede l'utilizzo di Antipiretici quali ASA (aspirina), Paracetamolo o Ketoprofene & altri FANS. Un eventuale trattamento antibiotico solo quando necessario per controllare complicanze/superinfezioni batteriche conosciute !!

E' chiaro però che l'approccio migliore, più efficace è quello della prevenzione. Sicuramente tutte le misure di biosicurezza che possono prevenire/evitare l'ingresso del virus influenzale in allevamento sono dovute e benvenute ( gestione AI/AO dei siti, quarantena e controllo dei soggetti in ingresso scrofaia, ecc) ma, nel caso dell' Influenza suina, la prevenzione significa Vaccinazione. Oggi sono disponibili vaccini affidabili che possono offrire una buona protezione ( riduzione della probabilità di infettarsi e riduzione significativa della sintomatologia clinica nel malaugurato caso di avvenuta infezione) nei confronti dei ceppi/sottotipi circolanti.

Ovviamente ciascun produttore, assieme al proprio veterinario, dovrà valutare il rapporto Costi/Benefici. Per decidere se vaccinare o meno si deve/dovrebbe conoscere: a) L'incidenza della malattia all'interno del "sistema produttivo" in considerazione e/o della zona/area. b) Il costo (€) completo di ogni singolo episodio che comprende non solo la mortalità e il costo dell'eventuale trattamento antibiotico o meno ma anche la perdita di accrescimento e il peggioramento dell' Indice di Conversione. Uno strumento utile per valutare il ritorno economico della vaccinazione viene anche dal regolare monitoraggio sierologico sui campioni di sangue di ritorno dal macello. In fine un accenno alla vaccinazione dei riproduttori e in particolare delle scrofe. Sicuramente la vaccinazione previene Ritorni in calore e possibili Aborti dovuti alla ipertermia determinata dal virus influenzale ma soprattutto la vaccinazione delle scrofe tende a livellare in su (a rendere più omogeneo) lo stato immunitario dell'allevamento/popolazione . In pratica aumenta l'immunità materna "prevenendo" possibili episodi Flu nei siti di svezzamento. In caso di vaccinazione delle madri è necessario misurare la durata della immunità materna nei suinetti svezzati per evitare interferenze con la eventuale vaccinazione dei lattoni ingrasso.

ATTI DEL 51 MEETING ANNUALE 2026

*Lazise (VR), 16-17 Aprile 2026*

# FATTORI CHIAVE CHE INFLUENZANO LA LONGEVITÀ DELLE SCROFE: SFIDE E SOLUZIONI

HEINONEN M.

*Università di Helsinki, Finlandia*

## LONGEVITÀ DELLE SCROFE

La longevità delle scrofe è un fattore critico nell'industria suinicola, con un impatto sia sull'efficienza economica sia sul benessere animale. Negli ultimi decenni, il benessere dei suini ha suscitato un crescente interesse da parte dei consumatori e della società. Un'elevata percentuale di scrofe morte o sottoposte a eutanasia può rappresentare un indicatore di scarso benessere animale all'interno del sistema produttivo (Engblom et al., 2007). Diversi fattori sono noti per influenzare la longevità delle scrofe e possono essere classificati, ad esempio, in salute della scrofa, condizioni ambientali, genetica e selezione, nutrizione, pratiche gestionali e ruolo dell'allevatore e del veterinario. Sebbene tutti questi aspetti siano importanti, questa breve presentazione si concentrerà principalmente sulla salute della scrofa (in particolare sulla zoppia), sull'ambiente/gestione e sui ruoli dell'allevatore e del veterinario.

Migliorare la longevità delle scrofe richiede un approccio multifattoriale. Gli allevatori mirano a mantenere le scrofe in produzione il più a lungo possibile e alcune scrofe vengono rimosse per scelta dai gruppi per mantenere un determinato livello produttivo. I tassi annuali di rimonta variano considerevolmente tra gli allevamenti (Rodriguez-Zas et al., 2003), ed è abbastanza comune una riforma di circa la metà delle scrofe ogni anno.

La riforma può essere una decisione volontaria quando l'allevatore decide di eliminare una scrofa e inviarla al macello, stimandola come non più produttiva. La durata ottimale della vita di una scrofa non è un numero fisso; dipende dalla sua salute, dalla dimensione della nidiata, dalla mortalità dei suinetti e dall'efficienza riproduttiva (Niemi et al., 2017; Kristensen e Sollested, 2004). Niemi et al. (2017) hanno riportato che, in generale, una scrofa sana può rimanere nell'allevamento fino a 6-10 parti, dopodiché è ottimale mantenere in produzione le scrofe con nidiate di dimensioni maggiori ed eliminare quelle con nidiate più piccole.

Le riforme non volontarie si verificano quando l'allevatore è costretto a praticare l'eutanasia su una scrofa o quando una scrofa muore spontaneamente. Queste riforme non pianificate possono essere definite morti in allevamento (OFDs): rappresentano le più costose e causano una sofferenza significativa per gli animali (Ala-Kurikka et al., 2019). È fondamentale distinguere tra i tre tipi di riforma (morte spontanea, eutanasia e macellazione) per identificare modelli specifici dell'allevamento (Bergman, 2019). Con queste informazioni, gli allevatori possono implementare le misure di controllo necessarie per ridurre i diversi tipi di riforma nei loro allevamenti. Una buona registrazione dei dati può facilitare questo processo (Bergman, 2019). Ridurre le OFDs ha un effetto positivo sull'economia aziendale e sul benessere delle scrofe, ma è necessario comprendere le cause che portano a un'elevata incidenza di OFDs prima di intervenire. Spesso i dati non vengono raccolti oppure non sono in una forma utilizzabile per migliorare la situazione negli allevamenti. Le necroscopie non vengono eseguite e le valutazioni degli allevatori sulle cause di morte, senza adeguate necroscopie, non sono affidabili. Ad esempio, Ala-Kurikka et al. (2019) hanno riscontrato che gli allevatori classificavano correttamente, parzialmente correttamente e in modo errato la causa di morte rispettivamente nel 15%, 29% e 55% di 65 scrofe sottoposte ad necroscopia.

## AMBIENTE E GESTIONE

I fattori ambientali, inclusi il controllo climatico e la dimensione dell'allevamento, influenzano significativamente la longevità delle scrofe. È stato riportato che grandi allevamenti e scrofe iperprolifiche presentano un elevato rischio di riforma (Ordaz et al., 2024). Molti dei fattori che influenzano la longevità delle scrofe sono di origine antropica. Le scrofe soffrono tipicamente di patologie legate alla produzione, non di malattie contagiose o infettive. L'ambiente che forniamo può causare loro stress cronico, che a sua volta è dannoso per il loro benessere e la produttività. Tuttavia, i fattori di rischio specifici che causano stress cronico non sono stati studiati a sufficienza (Ladoga et al., 2022). Molti possibili fattori di stress contribuiscono probabilmente allo stress fisiologico cronico nei suini, tra cui, ad esempio, sovraffollamento, alte temperature, restrizione alimentare, impossibilità di esplorare, pavimentazioni scomode e cattiva gestione. Alcuni di questi fattori possono anche rendere i suini più predisposti a sviluppare malattie legate alla produzione, come la zoppia, che a sua volta può causare stress cronico a causa del dolore e delle difficoltà di adattamento all'ambiente (Ladoga et al., 2022). Lo stress può compromettere il sistema immunitario, rendendo le scrofe più suscettibili alle malattie. Ad esempio, livelli elevati di cortisolo dovuti allo stress possono compromettere la funzione immunitaria (Liu et al., 2021).

Pertanto, ottimizzare le condizioni di stabulazione garantendo spazio adeguato, pavimentazioni di qualità e corrette pratiche di allevamento in gruppo consente di ridurre stress e aggressività, aspetti particolarmente importanti per prevenire tutti i tipi di malattie, in particolare la zoppia. Pratiche gestionali efficaci, come l'alimentazione separata per scrofette e scrofe, possono migliorare la longevità assicurando una condizione corporea ottimale e una buona salute riproduttiva. Le condizioni di stabulazione, inclusi i sistemi di allevamento in gruppo, possono influenzare la longevità. Fattori come la qualità del pavimento e la disponibilità di spazio sono fondamentali per ridurre i problemi agli arti e migliorare il benessere, soprattutto nelle situazioni in cui le scrofe combattono dopo il mescolamento (Verdon et al., 2015).

## SALUTE DELLE SCROFE, IN PARTICOLARE LA ZOPPIA

La salute e il benessere animale sono componenti fondamentali della produzione animale, sia dal punto di vista dei consumatori sia da quello dei produttori. Le malattie riducono l'appetito e l'efficienza alimentare e possono avere effetti duraturi sulla produttività anche quando sono state trattate con successo (Niemi et al., 2017).

Le malattie aumentano la mortalità e la riforma delle scrofe (Engblom et al., 2007). Problemi di salute come la zoppia e i disturbi riproduttivi sono tra le principali cause di riforma. Niemi et al. (2017) hanno concentrato il loro studio su due problemi sanitari comuni nei suini — la zoppia e la sindrome da disgalassia postpartum (PPDS) nelle scrofe — con particolare attenzione alla longevità. Queste due patologie influenzano il benessere delle scrofe e possono causare perdite di produttività, aumento della mortalità, costi di trattamento ed riforma precoce delle scrofe dall'allevamento (Niemi et al., 2017).

La zoppia è una condizione multifattoriale con componenti infettive, nutrizionali, legate alla stabulazione, alla gestione e/o genetiche (Heinonen et al., 2024). Sebbene sia fondamentale individuare le scrofe zoppe, diagnosticare la causa della zoppia, trattare adeguatamente gli animali e, se necessario, spostarli in un box infermeria, l'esecuzione di tutte queste procedure nelle condizioni di allevamento può essere difficile. Diagnosticare la zoppia nelle scrofe è complesso e la rilevazione e il trattamento sono spesso effettuati dagli operatori piuttosto che dai veterinari. Le diagnosi di zoppia si basano generalmente solo su valutazioni visive del

movimento e su esami clinici della scrofa. Non è noto quanto accuratamente gli operatori svolgano queste procedure in allevamento. Esistono diversi altri metodi per ottenere una diagnosi più precisa, come varie scale (ordinali o analogiche visive), analisi cinematica, analisi delle impronte, valutazione del tempo posturale, cambiamenti di postura, distribuzione del peso tra gli arti, spostamenti del peso e pressione del peso sugli unghioni, molti dei quali sono utilizzati solo in contesti di ricerca e non a livello aziendale (Nalon et al., 2013).

Le possibili diagnosi differenziali per la zoppia sono numerose. I disturbi articolari (artrite e osteocondrosi/artrosi) e le lesioni degli unghioni sono frequentemente riportati come le principali cause di zoppia e sono associati all'eutanasia o all'eliminazione delle scrofe (Kirk et al., 2005; Heinonen et al., 2006; Engblom et al., 2008). Tuttavia, ottenere una diagnosi definitiva a livello di allevamento è difficile e una diagnosi corretta è necessaria per trattare efficacemente la scrofa. Un esame approfondito degli unghioni è essenziale per una diagnosi accurata della zoppia, ma sollevare un arto dolente può richiedere molto lavoro. La maggior parte degli allevamenti suinicoli non dispone delle attrezzature specializzate necessarie per il pareggiamento degli unghioni, anche se questa pratica sarebbe fondamentale per prevenire e trattare la zoppia causata da lesioni degli unghioni. Il pareggiamento degli unghioni può migliorare la locomozione rendendo l'andatura più confortevole (Tinkle et al., 2017).

A livello di allevamento, l'obiettivo principale è prevenire la zoppia nelle scrofe. Ciò inizia con la selezione di scrofette con buona conformazione degli arti e buona salute generale per ridurre i tassi di riforma, e continua con una registrazione precoce e accurata dei dati sanitari per supportare le decisioni gestionali. La riforma deve essere effettuata immediatamente, se necessario, oppure il trattamento deve essere avviato il prima possibile per prevenire sofferenze inutili (Heinonen et al., 2006). Il trattamento farmacologico dovrebbe basarsi su una diagnosi corretta e includere, se necessario, lo spostamento della scrofa in un adeguato box infermeria.

## IL RUOLO DELL'ALLEVATORE E DEL VETERINARIO

Il ruolo degli allevatori è fondamentale: determinano le pratiche gestionali e l'ambiente in cui vive la scrofa. I livelli di istruzione delle persone che lavorano negli allevamenti suinicoli variano considerevolmente, così come le loro percezioni della salute e del benessere delle scrofe.

La collaborazione tra allevatore e veterinario aziendale è essenziale, soprattutto nei grandi allevamenti, poiché il lavoro veterinario deve essere svolto quotidianamente. I veterinari non possono visitare ogni allevamento ogni giorno; pertanto, forniscono servizi di consulenza sanitaria aziendale, che includono piani terapeutici per le scrofe malate e consigli su stabulazione, gestione e prevenzione delle malattie.

Il nostro gruppo ha studiato il processo di gestione e utilizzo dei farmaci nelle scrofe, con l'obiettivo di identificare rischi e misure di difesa associati al processo. Ciò includeva nell'analisi le istruzioni terapeutiche, le visite sanitarie aziendali, la logistica dei farmaci, lo stoccaggio dei medicinali, la valutazione della necessità di trattamento nelle scrofe, la somministrazione e registrazione dei farmaci, il monitoraggio dei trattamenti, la registrazione dei dati e il monitoraggio degli errori terapeutici (Tuomola et al., non pubblicato). I rischi sono stati identificati come fattori che compromettono l'uso sicuro dei farmaci. Nella nostra ricerca qualitativa abbiamo intervistato 15 veterinari suiatrici. Gli intervistati hanno evidenziato rischi tra cui eccessiva dipendenza dalla competenza degli operatori, insufficiente guida veterinaria, difficoltà comunicative e barriere informative, problemi nella logistica e disponibilità dei

farmaci, pratiche terapeutiche non igieniche o inappropriate, insufficiente esame clinico e follow-up delle scrofe malate, dolore legato alle iniezioni e gestione inadeguata del dolore, e difficoltà legate alle condizioni e alla gestione aziendale. La sicurezza nell'uso dei farmaci in allevamento è stata poco considerata nella letteratura scientifica e sono necessarie maggiori informazioni per migliorare la collaborazione tra allevatori e veterinari.

Considerando non solo l'uso dei farmaci ma anche la consulenza veterinaria in generale, gli studi mostrano che gli allevatori hanno spesso una visione positiva dei servizi di consulenza veterinaria, soprattutto quando vi sono comunicazione chiara, fiducia e benefici economici. Tuttavia, esistono delle sfide, come il ruolo percepito di controllo dei veterinari pubblici e la necessità per i veterinari di adattarsi a nuovi modelli di consulenza. Un'efficace consulenza veterinaria dipende dalla comprensione delle priorità degli allevatori, dalla costruzione della fiducia e dalla dimostrazione della fattibilità pratica ed economica delle raccomandazioni.

Per comprendere come gli allevatori percepiscono la consulenza veterinaria, è essenziale considerare i loro atteggiamenti verso le interazioni con i veterinari, i fattori che influenzano la accettazione e condivisione dei consigli e le dinamiche del rapporto veterinario-allevatore.

Le percezioni e gli atteggiamenti degli allevatori influenzano significativamente la salute e il benessere del gruppo. Ad esempio, gli allevatori di bovini da latte nel Regno Unito attribuiscono grande valore al contesto relazionale basato sulla fiducia e sulla comprensione condivisa con i veterinari, ritenendolo fondamentale per attuare cambiamenti basati sui consigli veterinari (Bard et al., 2019). Diversi fattori influenzano l'accettazione degli allevatori dei consigli veterinari. Gli allevatori sono più propensi a seguire raccomandazioni che dimostrano chiari benefici economici, come un miglioramento della redditività e una riduzione dei rischi (Anneberg et al., 2016). La fiducia nei veterinari e la fattibilità dell'applicazione dei loro consigli sono fattori importanti che influenzano la capacità dell'allevatore di aderire alle raccomandazioni (Svensson et al., 2019). Inoltre, una comunicazione efficace e la comprensione delle priorità e degli obiettivi degli allevatori sono essenziali affinché i veterinari possano fornire consigli pertinenti e applicabili (Bard et al., 2019).

Le dinamiche del rapporto tra veterinario e allevatore sono cruciali per la consulenza. Un approccio collaborativo, in cui i veterinari adattano i loro consigli alle esigenze e motivazioni specifiche degli allevatori, favorisce probabilmente un coinvolgimento positivo e una maggiore applicazione (Bard et al., 2019). In uno studio sulle misure di biosicurezza, le competenze e le capacità comunicative dei veterinari sono risultate fondamentali per fornire consigli efficaci, ed è stata evidenziata la necessità di una formazione continua per migliorare tali competenze (Howarth et al., 2021). Nuove conoscenze emergono costantemente e i veterinari devono far sentire la propria voce. La professione veterinaria affronta sfide come la concorrenza di altri fornitori di servizi di consulenza e la necessità di adattarsi a un modello orientato alla prevenzione delle malattie (Ruston et al., 2016), nonostante i veterinari siano considerati le principali fonti di informazione relative alla salute animale e alle malattie (Rivera-Gomis et al., 2026).

## BIBLIOGRAFIA

## STRATEGIE NUTRIZIONALI PER MIGLIORARE LA LONGEVITÀ DELLA SCROFA

BRONSVOORT B.

Negli ultimi anni, le prestazioni produttive delle scrofe sono aumentate in modo significativo, determinando un incremento del numero totale di suinetti nati. Parallelamente, si è osservato un aumento dei pesi allo svezzamento, in quanto le scrofe sono in grado di produrre quantità di latte per chilogrammo di peso vivo superiori rispetto alle bovine. Ciò comporta un notevole incremento delle esigenze fisiologiche, tanto che le scrofe possono essere considerate atleti, sotto il profilo metabolico. Tuttavia, all'interno dello stesso allevamento persiste una marcata variabilità individuale. L'obiettivo principale delle aziende è quindi quello di mantenere elevati livelli produttivi in modo efficiente, riducendo al minimo le problematiche sanitarie e gestionali. In tale contesto, un elemento chiave è rappresentato dall'adozione di strategie alimentari pratiche e mirate sul singolo animale. Un approccio individualizzato consente infatti di coniugare alte performance produttive con un miglioramento della longevità della scrofa; al contrario, l'assenza di tale approccio aumenta il rischio di riduzione della vita produttiva.

L'elevata variabilità tra scrofe, ad esempio in termini di produzione lattea, suggerisce la necessità di differenziare strategie alimentari, piani di somministrazione e formulazioni dietetiche. Tuttavia, nella pratica aziendale spesso si dispone di un numero limitato di mangimi. Mediante simulazioni modellistiche è stato possibile stimare i fabbisogni nutrizionali di diverse tipologie di scrofe nelle varie fasi produttive. Nella scrofa in lattazione, tali fabbisogni dipendono non solo dal livello produttivo, ma anche dall'entità della perdita di peso corporeo prevista. I risultati indicano che, nella fase iniziale della lattazione, le scrofe risultano frequentemente sottoalimentate, con conseguente marcata perdita di condizione corporea. Nella fase successiva, invece, le scrofe meno prolifiche tendono a ricevere apporti superiori ai fabbisogni, determinando un bilancio energetico positivo.

Per prevenire la sottoalimentazione nelle prime fasi della lattazione, una strategia comunemente adottata consiste nel massimizzare l'ingestione alimentare. Tuttavia, per ottenere un'elevata ingestione già dal primo giorno post-partum, è necessario che la scrofa sia in grado di mobilitare efficacemente le proprie riserve corporee nel periodo pre-parto. Ciò implica l'instaurarsi di un bilancio energetico negativo già prima del parto. L'applicazione di questa strategia consente di incrementare rapidamente l'assunzione di alimento dopo il parto. Inoltre, nella seconda metà della lattazione, si pone già l'attenzione sulla preparazione della scrofa al ciclo riproduttivo successivo. In questa fase, l'animale dovrebbe mantenersi in un bilancio energetico negativo ottimale, ricevendo un apporto nutrizionale adeguato alla produzione reale. Un bilancio energetico insufficiente o, al contrario, un apporto eccedente i fabbisogni possono compromettere sia le prestazioni produttive sia la longevità. Ne deriva la necessità di adottare strategie alimentari flessibili e modulabili in funzione del singolo animale, attuabili attraverso scelte gestionali nei momenti chiave: durante la gestazione, al parto e intorno al decimo giorno di lattazione.

Il raggiungimento di un bilancio energetico negativo ottimale durante la lattazione richiede che la scrofa presenti una condizione corporea adeguata al momento del parto, ottenuta attraverso un corretto recupero nel periodo di gestazione. Anche nelle scrofe gestanti i fabbisogni nutrizionali risultano altamente variabili. Simulazioni modellistiche hanno evidenziato come le strategie di recupero debbano essere differenziate in base alla tipologia di animale. Nel

caso di scrofe che necessitano di recuperare le riserve corporee dopo la lattazione precedente, è fondamentale promuovere tale recupero già nelle prime fasi della gestazione. Qualora si miri a ottenere il 75% della crescita extrauterina entro i primi 42 giorni, i fabbisogni in termini di alimento e nutrienti risultano particolarmente elevati. Tuttavia, le scrofe di ordine di parto più avanzato possono presentare esigenze inferiori di recupero, rendendo necessaria una modulazione dell'alimentazione nelle prime fasi della gestazione.

Dopo questa fase iniziale, il periodo intermedio della gestazione è spesso sottovalutato. In realtà, anche in questa fase si verifica una crescita significativa della scrofa. Sebbene gran parte di tale incremento sia rappresentata da fluidi corporei, lo sviluppo della placenta e del cordone ombelicale riveste un ruolo cruciale per la vitalità e la robustezza dei suinetti. Schemi alimentari del tipo "alto-basso-alto" possono comportare il rischio di sottoalimentazione nelle scrofe meno dominanti all'interno del gruppo. Al contrario, la fase finale della gestazione tende a essere sovrastimata. Nonostante l'intensa crescita fetale, associata ai fabbisogni di mantenimento e allo sviluppo della ghiandola mammaria, si fa comunque affidamento sulla capacità della scrofa di mobilitare le riserve corporee. In questa fase, l'obiettivo principale dovrebbe essere il mantenimento di una buona condizione fisica e l'avvio di un moderato bilancio energetico negativo, evitando eccessi alimentari.

Per ottenere un allevamento caratterizzato da scrofe longeve e in grado di gestire efficacemente le proprie riserve corporee, è fondamentale partire da scrofette idonee. Il miglioramento genetico ha portato alla selezione di soggetti più pesanti ma più magri, con ridotte riserve lipidiche. Di conseguenza, è necessario favorire un maggiore sviluppo ponderale. A partire da circa 90 giorni di età, le scrofette entrano nella fase puberale, durante la quale si sviluppano gli organi riproduttivi. Strategie alimentari restrittive, comunemente adottate, possono determinare uno sviluppo incompleto dell'apparato riproduttivo. Per ottenere soggetti con elevata capacità produttiva e buona longevità, è quindi essenziale garantire un adeguato peso corporeo minimo sia al momento della prima inseminazione sia fino al primo parto. Durante la prima gestazione, inoltre, la scrofetta continua il proprio accrescimento corporeo.

Analogamente alle scrofe pluripare, anche le primipare possono trovarsi in bilancio energetico negativo durante la lattazione; tuttavia, esse sono maggiormente esposte al rischio di un'eccessiva perdita di riserve corporee. È pertanto fondamentale limitare la perdita di peso nelle primipare durante la lattazione e assicurare adeguati pesi corporei sia all'inseminazione sia al parto. Ciò implica l'adozione di strategie alimentari specifiche e differenziate rispetto alle scrofe pluripare.

In conclusione, il miglioramento della longevità delle scrofe, mantenendo al contempo elevati livelli produttivi, richiede l'adozione di strategie alimentari individualizzate. A tal fine, è fondamentale basarsi sulla valutazione della condizione corporea e dello sviluppo dell'animale, individuando momenti decisionali chiave lungo tutto il ciclo produttivo. Sia nella fase di allevamento delle scrofette, sia durante la gestazione e la lattazione, l'applicazione di interventi nutrizionali mirati consente di ottimizzare le performance e prolungare la vita produttiva delle scrofe.

## **GESTIRE I NUOVI MODELLI DI STABILAZIONE DELLE SCROFE**

LUNDSGAARD M.

Lavorare in accordo con il comportamento naturale delle scrofe è fondamentale nei sistemi di allevamento in gruppo, poiché questo tipo di sistema consente e richiede, comprensione e rispetto delle esigenze degli animali.

Le scrofe sono animali sociali con una chiara gerarchia, una necessità comportamentale di costruire il nido prima del parto, periodi di riposo definiti e schemi alimentari e di attività costanti. Se la gestione non tiene conto di questi modelli comportamentali, si verificano rapidamente agitazione, combattimenti, stress e una riduzione della produttività. Una buona gestione negli allevamenti in gruppo riguarda quindi più della sola tecnologia e delle attrezzature, si tratta di struttura, visione d'insieme e intervento tempestivo. Quando i gruppi sono formati correttamente, quando vi è spazio sufficiente per l'alimentazione, adeguate vie di fuga e condizioni tranquille durante l'alimentazione e la gestione, il livello di conflitto si riduce significativamente. Ciò si traduce in un minor numero di lesioni, una migliore salute degli unghioni e prestazioni riproduttive più stabili. Allo stesso tempo, lo stress ha un impatto diretto negativo sull'estro, sulla gravidanza e sulla funzione immunitaria.

Lavorando con e non contro il comportamento naturale delle scrofe, è possibile migliorare sia il benessere animale sia le performance economiche. Scrofe calme sono scrofe più produttive. Nei sistemi di allevamento in gruppo, la gestione è quindi il fattore chiave che determina la differenza tra successo e frustrazione.

La conoscenza del comportamento, unita a una pratica quotidiana coerente, costituisce la base per risultati stabili e animali sani.

## ANIMALISMO COME NUOVA RELIGIONE

BERTAGLIO A.

In questo intervento si analizza il fenomeno contemporaneo del veganismo e dell'animalismo come espressioni di una più ampia trasformazione culturale e antropologica delle società occidentali. Per farlo, si fa riferimento al libro "Malafede Veg - Animalismo come nuova religione" di Andrea Bertaglio, in fase di pubblicazione.

In un contesto segnato dalla perdita di riferimenti tradizionali (religiosi, politici e sociali), tali movimenti assumono sempre più le caratteristiche di una "religione laica", capace di offrire senso, identità e appartenenza. Per farlo, Bertaglio spiega in modo autobiografico come sia passato dalla religione cattolica a quella ambientalista, per notare dopo alcuni anni come la struttura dogmatico-religiosa delle due dottrine fosse quasi sovrapponibile, con però una sostanziale differenza: mentre la religione cristiana dà modo di redimersi, quella ambientalista e animalista non lo permettono, in quanto l'origine di ogni male, quindi di ogni peccato, è l'essere umano. Ecco perché oggi quella "green" è sostanzialmente una filosofia anti-umana.

Attraverso un approccio critico e interdisciplinare, l'obiettivo è quello di esplorare le radici storiche, filosofiche ed economiche del veganismo, evidenziando analogie con strutture religiose (dogmi, rituali, senso di colpa, proselitismo) e collegandole a correnti di pensiero come l'etica protestante, l'utilitarismo e l'altruismo efficace. Particolare attenzione è dedicata al ruolo della Chiesa Avventista del Settimo Giorno nella nascita dell'industria alimentare "plant-based" e alla trasformazione di ideali salutisti e spirituali in un sistema industriale globale basato su prodotti ultra-processati sostitutivi della carne.

Il lavoro indaga inoltre le dinamiche psicologiche e sociali che alimentano la diffusione dell'animalismo, tra cui il bisogno di metafisica, la solitudine, la perdita di senso e la crescente percezione dell'essere umano come elemento negativo per il pianeta. Viene criticato il processo di umanizzazione degli animali e la conseguente distorsione della realtà biologica e agricola, nonché il ruolo dei media e delle ben finanziate ONG nella costruzione di una narrazione polarizzata e spesso disinformata.

Infine, si mettono in luce le implicazioni economiche e politiche del "Veg Marketing", sostenendo che dietro la diffusione globale di tali ideologie vi siano interessi finanziari rilevanti, capaci di influenzare ricerca scientifica, politiche pubbliche e percezione collettiva. L'obiettivo non è fornire un'analisi esaustiva, ma stimolare una riflessione critica sulle contraddizioni dell'animalismo contemporaneo e sul rapporto tra etica, scienza e interessi economici nella società odierna.

## **SOSTENIBILITÀ E RUOLO POSITIVO DELLA PRODUZIONE ZOOTECNICA**

PASCUAL J.

Il dibattito pubblico sugli alimenti di origine animale è spesso dominato da narrazioni parziali e ideologicamente orientate, che si concentrano quasi esclusivamente sugli impatti negativi percepiti della produzione zootecnica.

Questa presentazione si propone di riequilibrare la discussione evidenziando, sulla base di evidenze scientifiche, i numerosi e predominanti contributi positivi dei sistemi zootecnici ai sistemi alimentari e alla società.

La produzione zootecnica consente la valorizzazione di risorse altrimenti non idonee al consumo umano, convertendole in alimenti ad alto valore nutrizionale essenziali per la sicurezza alimentare globale. Supporta la fertilità del suolo, riduce lo spreco alimentare, contribuisce alla produzione di energia rinnovabile e sostiene i territori non arabili.

La presentazione sottolineerà inoltre i significativi progressi raggiunti in termini di efficienza, benessere animale e sostenibilità ambientale, in contrasto con affermazioni sulle emissioni spesso sovrastimate. Gli alimenti di origine animale restano cruciali per la salute umana, lo sviluppo rurale e la riduzione della povertà. Una valutazione equa della sostenibilità richiede pertanto una prospettiva scientifica, sistemica e non ideologica.

# DIVARIO GENERAZIONALE: TRA VOCAZIONE E BENESSERE PROFESSIONALE, LA SUIATRIA È A UN BIVIO?

SCOLLO A.

*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino*

Negli ultimi anni, il settore suinicolo ha attraversato trasformazioni profonde, che non riguardano soltanto gli aspetti produttivi e sanitari, ma anche il modo in cui la professione veterinaria viene vissuta e interpretata. Cambiato è anche il modo in cui la società percepisce il lavoro del Medico Veterinario che opera nella zootecnica. Parallelamente, è sempre più diffusa all'interno del comparto suinicolo la percezione di una difficoltà nel ricambio generazionale, spesso sintetizzata nella constatazione che “mancano giovani” disposti a intraprendere o mantenere la professione di campo<sup>1</sup>.

In questo contesto, emerge con crescente evidenza un possibile divario tra generazioni: da un lato una componente più matura, fortemente radicata in una visione della professione fondata su vocazione, disponibilità e adattamento; dall'altro una nuova generazione che, pur mantenendo un elevato livello di motivazione, esprime esigenze diverse, in particolare in termini di sostenibilità della vita professionale garantita da un miglior equilibrio tra vita privata e lavoro.

L'analisi presentata nasce proprio con l'obiettivo di esplorare questo scarto e, al tempo stesso, di fornire elementi utili a comprendere se e come il settore possa diventare più attrattivo per i giovani professionisti. Il lavoro è frutto di una collaborazione interdisciplinare tra il settore veterinario suinicolo e l'ambito delle scienze sociali, con l'obiettivo di integrare competenze tecniche e strumenti interpretativi utili a leggere le dinamiche professionali. A tal fine sono state indagate percezioni, aspettative e priorità di 87 veterinari operanti nel settore suinicolo, distribuiti per età e ambito professionale.

Un primo elemento di continuità tra generazioni riguarda la forte identificazione con il ruolo tecnico-professionale. Le parole associate alla professione sono state ricondotte a tre principali dimensioni — caratterizzazione, motivazione e durezza — che consentono di leggere in modo articolato la rappresentazione del suiatra. In questo contesto, termini come “professionalità”, “competenza”, “aggiornamento” e “specializzazione” rappresentano il nucleo centrale della dimensione di caratterizzazione, indipendentemente dall'età. A questa si affianca una componente motivazionale ancora significativa, in cui la “passione” continua a emergere come elemento identitario, in particolare tra i più giovani.

Tuttavia, accanto a questi elementi condivisi, emergono differenze rilevanti. La percezione della “durezza” del lavoro — fatta di impegno, stress, burocrazia e carichi operativi elevati — è trasversale, ma viene interpretata in modo diverso. Nella generazione più matura appare come una componente quasi intrinseca e accettata della professione; nei più giovani, invece, tende a essere messa in relazione con la necessità di ridefinire le condizioni del lavoro, piuttosto che subirle.

Questa differenza di prospettiva emerge in modo ancora più evidente nell'analisi delle priorità. A livello complessivo, biosicurezza strutturale e orari di lavoro congrui si confermano come elementi centrali. Tuttavia, mentre la generazione più esperta mantiene un forte orientamento verso aspetti strutturali e tecnico-organizzativi, i più giovani attribuiscono maggiore rilevanza a elementi legati alla qualità dell'ambiente di lavoro e alla sostenibilità personale, come la gestione degli orari, gli spazi e le condizioni operative quotidiane.

<sup>1</sup> [https://fve.org/cms/wp-content/uploads/ap15\\_VetVision\\_Shortage\\_Vets\\_FYI.pdf](https://fve.org/cms/wp-content/uploads/ap15_VetVision_Shortage_Vets_FYI.pdf)

In particolare, tra i giovani professionisti emerge con forza la richiesta di un'innovazione che non sia esclusivamente tecnologica, ma anche organizzativa: un'innovazione "quotidiana", che migliori concretamente le condizioni di lavoro e renda la professione compatibile con aspettative di vita diverse rispetto al passato. Questo aspetto appare centrale soprattutto per la libera professione, che rischia altrimenti di perdere attrattività nel lungo periodo.

Il quadro che ne deriva suggerisce che la percezione di una carenza di giovani non sia riconducibile a una sola causa. Alla base si osserva un mutato contesto sociale e culturale, in cui la crescente rilevanza di dimensioni etiche ed emotive nel rapporto uomo-animale tende a orientare il giudizio nei confronti delle professioni legate alla produzione animale, influenzando le scelte professionali dei giovani. A questa componente si affianca quanto emerso dall'analisi, ovvero un disallineamento tra ciò che la professione offre e ciò che le nuove generazioni considerano sostenibile e desiderabile. In questo senso, i risultati indicano alcune leve potenzialmente strategiche per aumentare l'attrattività del settore: una maggiore attenzione alle condizioni di lavoro, che implica un miglior equilibrio tra vita privata e lavoro, e agli ambienti professionali, che favoriscano crescita, formazione e qualità della vita.

Un ulteriore elemento di differenziazione tra generazioni riguarda il rapporto con la formazione. La generazione più matura si è sviluppata in un contesto in cui l'accesso alle informazioni era più limitato e la costruzione delle competenze richiedeva un investimento personale significativo, spesso basato su autonomia ed esperienza diretta. Le nuove generazioni, invece, si collocano in un contesto in cui l'accesso alla conoscenza è più immediato e diffuso, e tendono a considerare la formazione come una componente più strutturata e sostenuta dal contesto lavorativo. In questo senso, la disponibilità di percorsi formativi continui e di qualità diventa un elemento rilevante nelle scelte professionali.

In questa prospettiva, il divario tra vocazione e benessere professionale non deve essere letto come una frattura, ma come un segnale di evoluzione. La sfida per il settore sarà quella di integrare queste due dimensioni: preservare il valore della professione e della sua complessità, offrendo al contempo condizioni di lavoro sostenibili e coerenti con le aspettative delle nuove generazioni.

La suaiatria si trova oggi, quindi, non tanto di fronte a una crisi, quanto a un bivio: continuare lungo modelli consolidati o ripensare, anche a partire dalle esigenze emergenti, il modo in cui la professione viene organizzata e proposta alle generazioni future.

## **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

# IMPIEGO DELL'ALTRENOGEST NEL MANAGEMENT DEI RITORNI CICLICI SU SCROFE GESTITE A BANDE PENTASETTIMANALI: STUDI PRELIMINARI

## *USE OF ALTRENOGEST IN THE MANAGEMENT OF IN OESTRUS RETURNS IN FIVE-WEEKS BATCH FARROWING SISTEM FARMS: PRELIMINARY STUDIES*

MAZZONI C.<sup>1</sup>, TONON F.<sup>1</sup>, STRADI L.<sup>1</sup>, CATELLANI G.<sup>1</sup>, SCOLLO A.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>*Suivet sas, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia;*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO)*

**Parole chiave:** banda pentasettimanale, ritorni ciclici, Altrenogest

**Key words:** *five-weeks batch farrowing, in cycle returns, Altrenogest*

### **Riassunto**

La gestione delle scrofe in bande pentasettimanali rappresenta una strategia sempre più diffusa negli allevamenti suinicoli europei grazie ai vantaggi sanitari e organizzativi legati al principio del tutto pieno–tutto vuoto. Tuttavia, uno dei principali limiti di questo sistema è la gestione dei ritorni ciclici (18–24 giorni dall'inseminazione), che risultano asincroni rispetto al ritmo produttivo della banda e generano difficoltà gestionali, aumento dei giorni improduttivi e costi aggiuntivi.

Il presente studio preliminare ha valutato l'impiego dell'Altrenogest somministrato nelle prime fasi della gestazione come possibile strumento per sincronizzare le scrofe non gravide con la banda successiva, estendendo l'intervallo tra due cicli estrali da circa 21 a 35 giorni. La prova è stata condotta in un allevamento da circa 740 scrofe gestite a banda pentasettimanale. Sono state arruolate 80 scrofe inseminate, suddivise in quattro gruppi trattati con Altrenogest a partire dal 12°, 14°, 16° o 18° giorno post-inseminazione.

I risultati mostrano che i trattamenti iniziati al 12°, 14° e 16° giorno hanno impedito la comparsa del ritorno in estro nel 100% dei casi osservati e consentito, nelle scrofe non gravide, la sincronizzazione del calore con la banda successiva e la successiva fecondazione con esito positivo. Il trattamento iniziato al 18° giorno si è invece dimostrato inefficace.

L'approccio proposto ha determinato una riduzione di circa 35 giorni improduttivi rispetto alla gestione convenzionale e un significativo miglioramento dei costi di gestione. Sebbene basati su un numero limitato di animali, questi risultati suggeriscono che la somministrazione di Altrenogest tra il 14° e il 16° giorno dall'inseminazione possa rappresentare una strategia promettente per ottimizzare il management riproduttivo nelle aziende a banda pentasettimanale.

### **Abstract**

Five-week batch farrowing systems are increasingly adopted in European pig production due to their sanitary and management advantages, particularly in relation to the all-in/all-out principle. However, one of the main limitations of this system is the management of cyclic returns occurring 18–24 days after insemination, which are not synchronized with the production rhythm of the batch system. This mismatch often results in management difficulties, increased non-productive days and higher economic costs.

The aim of this preliminary study was to evaluate whether the administration of Altrenogest during early gestation could synchronize non-pregnant sows with the following batch by extending the oestrous cycle interval from the physiological 21 days to approximately 35 days,

thus making it compatible with the five-week production schedule.

The study was conducted on a commercial farm with approximately 740 sows managed under a five-week batch farrowing system. A total of 80 inseminated sows were randomly allocated into four groups receiving Altrenogest starting on day 12, 14, 16 or 18 after insemination. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound at day 24 post-insemination.

Results showed that treatments starting on day 12, 14 and 16 successfully prevented the expected return to oestrus in all observed cases and allowed non-pregnant sows to express oestrus synchronized with the following batch, enabling successful insemination and pregnancy confirmation. Conversely, treatment initiated on day 18 proved ineffective.

This approach reduced non-productive days by approximately 35 compared with the conventional management strategy and resulted in a significant economic advantage. Although based on a limited sample size, these preliminary findings suggest that Altrenogest administration between days 14 and 16 after insemination may represent a promising strategy to improve reproductive management in five-week batch farrowing systems.

## **INTRODUZIONE**

La strategia di allevamento che prevede lo svezzamento di gruppi di scrofe a più settimane di distanza, definita a bande plurisettimanali, è andata crescendo nel corso degli ultimi anni a discapito del sistema settimanale a flusso continuo già largamente diffuso. Storicamente le bande nascono dalla necessità di avere lotti più numerosi di suini allo svezzamento con un'età più uniforme così da efficientare i trasferimenti e gli spazi negli svezzamenti. Riducendo la frequenza degli spostamenti, inoltre, risulta più facile l'applicazione di un corretto TPTV (Tutto/Pieno Tutto/Vuoto) ed aumenta il tempo che le maestranze hanno a disposizione per l'igienizzazione delle strutture, veri aspetti cruciali del vantaggio di una gestione in bande poiché di grande impatto sulla sanità (Bown, 2006; Baumert, 2017, Vangroenweghe et al., 2012).

Le bande generalmente più praticate in azienda, sono quelle a 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. Tuttavia, le bande che più si prestano alla migliore gestione dei vuoti e dei lavaggi e che permettono di realizzare un ottimo TPTV degli ambienti, con conseguente loro migliore igienizzazione, sono quelle con un lungo intervallo in settimane fra le due svezzate consecutive. Pertanto, la banda a quattro, ma ancora meglio quella a cinque settimane, permettono di ottenere i risultati più interessanti (Lurette et al., 2008). Mekerke e Leneveu (2006) hanno inoltre suggerito che la rigorosa separazione dei gruppi di età in un sistema quadrisettimanale e in un pentasettimanale costringono ad avere un solo lotto di scrofe in sala parto, e questo potrebbe migliorare le condizioni di salute e, di conseguenza, anche le prestazioni di crescita dei suini nell'allevamento.

L'effetto di "sanificazione dell'azienda" operato dalle bande, più evidente in quelle "lunghe" (a 4 o 5 settimane), ha un andamento a cascata partendo dalle scrofe per propagarsi poi nei siti due e tre. Ed è per questo motivo che negli ultimi anni, causa anche della diffusione di alcuni virus ad alta virulenza (PRRSv) e della riduzione obbligatoria dell'uso dell'antibiotico, in grado di farne riemergere altri (Salmonella spp), hanno costretto molti allevatori ad adottare questi sistemi di management aziendale che stanno avendo una considerevole diffusione in diversi paesi europei, Spagna in primis, assumendo connotati di vere e proprie terapie zootecniche (Mazzoni C e Scollo A. 2024).

### **Criticità della banda pentasettimanale:**

A fare da contrapposizione ai numerosi vantaggi della banda pentasettimanale, vanno considerati anche gli svantaggi spesso di natura manageriale, che sono in grado di limitarne la diffusione all'interno delle aziende suinicole. Si tratta, infatti, di sistemi rigidi che poco si prestano a variazioni; pertanto, richiedono molta applicazione e spirito di sacrificio da parte del personale.

Inoltre, sebbene le difficoltà legate alla sincronizzazione delle scrofette al fine di poterle introdurre correttamente nelle varie bande siano oggi state superate dalla somministrazione dei progestinici di sintesi come l'Altrenogest, rimangono un nodo critico che deve essere sempre attenzionato. Anche l'utilizzo irregolare dei verri può rappresentare un problema serio soprattutto per quelle aziende che gestiscono questi animali dall'interno, ma anche da chi acquista seme dai centri verri specializzati non sempre in grado di approvvisionare allevamenti di grandi quantitativi di dosi in un breve lasso di tempo. Particolarmente importante è la gestione degli spazi, dove in ogni caso lo spostamento fra sala parto e gestazione di lotti più numerosi di scrofe da svezzare, richiedono adeguate superfici per poter accogliere contemporaneamente tanti animali. Analogo punto critico è legato ai siti 2 e 3 dove la pianificazione dei flussi di lotti di suini così numerosi deve essere fatta in maniera oculata tenendo in considerazione il dimensionamento di questi siti ed i tempi di pulizia.

Per quanto riguarda il management si osserva una distribuzione delle ore di lavoro del tutto anomala, con picchi di ore di lavoro in alcune settimane. Nel dettaglio le settimane degli svezzamenti (S), la settimana delle fecondazioni (F) e quella dei parti (P), saranno caratterizzate da una notevole intensità di attività, alternati a settimane successive nelle quali il lavoro è decisamente meglio distribuito nel tempo.

Infine, la gestione dei ritorni ciclici (RC) fra i 18-24 giorni dall'inseminazione rappresenta forse problema manageriale di maggiore entità. Alla base di questo abbiamo la rigidità del sistema dove le coperture devono essere fatte tassativamente ogni 5 settimane, all'interno della banda delle inseminazioni, aspetto che poco coincide con la regolarità dei ritorni a 21 giorni tipici della fisiologia della scrofa e pertanto fuori dalle giornate dell'inseminazione della banda (Fuoribanda). Questo è il motivo per il quale spesso in azienda si debba ricorrere a dei trattamenti ormonali a base di progestinico (Altrenogest), così da poter sincronizzare l'attività ciclica delle scrofette, ma anche delle scrofe, nella settimana di coperture della banda (Kingston, 2004). Un'altra possibile soluzione riguarda la vendita delle scrofe di ritorno per evitare la loro non semplice gestione. In questo caso la scelta passa dalle prestazioni della riproduzione ovvero tanto migliori saranno, tanto sarà minore il numero dei ritorni da vendere. Viceversa, se le prestazioni sulla riproduzione fossero non soddisfacenti, il numero di questi ritorni potrebbe essere tale da non permetterne una loro riforma senza incidere negativamente sia sul tasso di rimonta annuale che sul teorico delle inseminazioni e quindi sui flussi di produzione.

L'Altrenogest è un progestinico sintetico appartenente alla classe dei 19-norsteroidi, largamente impiegato nella specie suina per la sincronizzazione dell'estro e la messa in banda delle scrofette, ma anche delle scrofe. Il suo meccanismo d'azione si basa sull'attivazione dei recettori progestinici a livello ipotalamico e ipofisario, determinando un'inibizione della secrezione pulsatile di GnRH e, conseguentemente, una riduzione della liberazione di LH e FSH. Tale soppressione impedisce la crescita follicolare terminale e il verificarsi del picco preovulatorio di LH, mantenendo l'animale in uno stato funzionale analogo alla fase luteinica impedendo di fatto la manifestazione del calore. Alla sospensione del trattamento tutto l'asse ipotalamo ipofisario si viene a riattivare, consentendo una rapida crescita follicolare e la conseguente venuta in calore (Knox, 2015; Estienne et al., 2013).

L'obiettivo del presente studio che, per il ridotto numero di campioni deve essere annoverato fra gli studi preliminari, è quello di esplorare, proprio grazie all'uso dell'Altrenogest, una possibile soluzione per migliorare la gestione dei ritorni ciclici fra i 18 ed i 24 giorni dalla inseminazione che nel contesto del management della banda pentasettimanale rappresentano un vero problema dalla cui risoluzione dipende gran parte del successo zootecnico di questo sistema di lavoro.

## **MATERIALI E METODI**

### **Struttura aziendale**

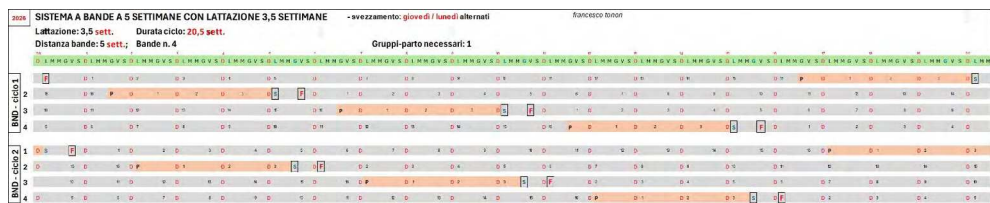
L'azienda agricola oggetto dello studio, si trova ubicata nella Pianura Padana, e si dedica

all'allevamento di suini destinati alla produzione del prosciutto di Parma DOP. Si tratta di un allevamento a sito uno convenzionale dove allo svezzamento i suinetti vengono trasferiti in un sito due a poche centinaia di metri. L'azienda ha una consistenza numerica di circa 740 scrofe di genetica ibrida olandese con rimonta interna, accasata con frequenza bimestrale in una struttura interna ma isolata dal resto della scrofaia. La consistenza del personale è di tre dipendenti con il supporto di una quarta persona per lo svezzamento. Il giro delle scrofe dallo svezzamento al parto successivo segue un regolare flusso di movimentazione ottemperante delle normative vigenti in tema di biosicurezza e benessere, a tale riguardo tutti i suinetti vengono svezzati a coda integra. L'alimentazione del sito è garantita dall'arrivo di mangime finito del commercio, in grado di soddisfare tutte le necessità del processo produttivo e viene distribuito agli animali in forma di broda tanto in gestazione quanto in sala parto (tre pasti giornalieri). Le curve di ingestione sono fornite dalla casa genetica.

Lo stato sanitario del sito è definibile convenzionale: PRRSv e Circovirus di tipo 2 (PCV2) positivo, APP Biotipo 1 sierotipo 9 positivo, *Streptococcus suis* positivo, *Haemophilus parasuis* positivo, *Lawsonia intracellularis*, e *Salmonella choleraesuis* positivo.

### Management dell'azienda

L'azienda presenta un management a banda penta settimanale con lattazione fra i 23 e i 24 giorni. Tale soluzione permette, per questo tipo di banda, il miglior compromesso fra età dei suinetti allo svezzamento, periodo di vuoto sanitario fra i parti di due bande consecutive, che sarà così di circa dieci giorni (Figura 1), e management aziendale. In questo contesto le maestranze dovranno svezzare tutte le scrofe ed i suinetti presenti in tutte le gabbie parto, lavarle, disinfettarle e fecondare le scrofe svezzate. Inoltre, dovranno trasferire tutte le scrofe della banda successiva nelle gabbie parto da poco lavate per l'imminente parto. Vale la pena ricordare che, per sostenere questo tipo di banda, si dovrà procedere allo spostamento della svezzata di tre o quattro giorni al termine di ogni ciclo di interparto, quindi ogni quattro mesi come evidenziato nel passaggio dal ciclo uno al ciclo due della Figura 2. Quindi per quattro mesi lo svezzamento avverrà al lunedì e per i quattro mesi successivi lo svezzamento sarà di giovedì e così via.



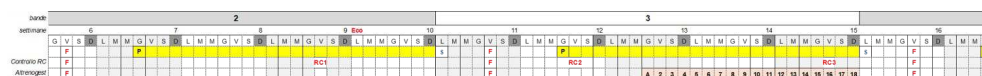
**Figura 1:** Sviluppo della banda pentasettimanale con i 23-24 giorni di lattazione. Come si può vedere, fra lo svezzamento della banda due del primo ciclo (al lunedì) e quello della banda due del secondo ciclo, si assiste ad uno slittamento di tre giorni che porta a svezzare di giovedì. Di conseguenza al ciclo successivo si assisterà ad uno svezzamento in avanti di quattro giorni in modo da tornare al lunedì.

**Figure 1:** Development of the five-week batch farrowing with 23-24 days of lactation. As can be seen, between the weaning of batch two of the first cycle (on Monday) and the batch two of the second cycle, there is a three-day shift that leads to weaning on Thursday. Consequently, in the next cycle, weaning will be moved forward by four days to return on Monday.

Relativamente ai dati produttivi l'azienda presenta una fertilità ecografica variabile fra il 78-83% ed una portata al parto fra il 73-78% che rendono pertanto la gestione dei RC, a causa del loro elevato numero, un tema di grande rilievo sia per i costi di gestione (Altrenogest e posti) che per il danno sui flussi dal momento che non tutte le bande riescono ad avere rispettati i teorici di coperture previsti. Dotata di 175 gabbie parto per banda l'azienda, visti i risultati della fertilità, è costretta a lavorare su 220/225 inseminazioni per raggiungere l'obiettivo dei parti/banda.

### Gestione dei ritorni e loro impatto

Il management dei ritorni in una banda (BD) pentasettimanale rappresenta da sempre uno dei fattori deterrenti per una serena scelta di questo sistema di lavoro. Sfortunatamente, infatti, il ritmo degli eventi in una banda pentasettimanale, male si presta al ritmo della fisiologia della riproduzione della scrofa che è a cadenza trisettimanale (18-24 giorni). Quindi le inseminazioni dei ritorni ciclici (RC) cadrebbero sempre fuori dalla banda delle inseminazioni (fuoribanda). Nella figura 2, all'interno dei gruppi di Controllo RC, viene rappresentata la soluzione più comunemente utilizzata oggi per la gestione dei ritorni e delle vuote eco con la lattazione a 23-24 giorni: una scrofa inseminata in BD 2 il venerdì della settimana 6, qualora non gravida, ritorna in ciclo venerdì della settimana 9 (RC1) quindi fuori banda delle inseminazioni della BD 3 che sarebbero al venerdì della settimana 11. L'RC successivo (RC2) avverrebbe il venerdì della settimana 12 comunque ancora fuori dalla BD delle inseminazioni.



**Figura 2:** Rappresentazione della gestione convenzionale dei ritorni ciclici (RC1) e delle scrofe vuote eco, in un contesto di bande pentasettimanali con la lattazione a 23-24 giorni.

**Figure 2:** Representation of the conventional management of cyclic returns (RC1) and empty eco sows, in a context of five-week batch farrowing with lactation at 23-24 days.

È per questo motivo che, in maniera convenzionale, al fine di concentrare le inseminazioni nella settimana corretta tutti gli RC, così come anche le vuote all'ecografia, vengono sottoposte a trattamento con Altrenogest a partire dal giovedì della settimana 13 per diciotto giorni consecutivi (assieme al gruppo delle scrofette già pianificate), così da ottenere un calore da inseminare alla volta del venerdì della settimana 16 che coincide con le fecondazioni della BD 4 (Figura 2).

Questo tipo di gestione ha certamente un grosso impatto economico in aziende come questa, ove la fertilità non presenta risultati ottimali, come dimostrano i conti in Tabella 1.

Evento	Giorni improduttivi	Trattamento con Altrenogest (gg)	Costo giornaliero	Totale
Intervallo RC1-RC2	21		3.20€	67.2€
Intervallo RC2-RC3	21		3.20€	67.2€
Intervallo RC3-F della BD4	7		3.20€	22.4€
Trattamento con Altrenogest		18	0.50€	9.00€
Totali	49			165.80€

**Tabella 1:** Conto economico della gestione convenzionale di un ritorno ciclico in banda pentasettimanale con lattazione a 23-24 giorni. L'RC1 non è stato volutamente considerato dal momento che è un evento negativo ma atteso. Al costo giornaliero per scrofa è stato attribuito un valore di 3.20€/die (dati SIP Consultors 2026) mentre quello del costo farmacologico per l'Altrenogest è stato di 0.50€/die (dati del mercato).

**Table 1:** Profit and loss for conventional management of a cyclical return in a five-week batch farrowing with 23-24 days of lactation. RC1 was intentionally not considered since it is a negative expected event. The daily cost per sow was assigned a value of €3.20/day (SIP Consultors 2026 data), while the pharmacological cost for Altrenogest was €0.50/day (market data).

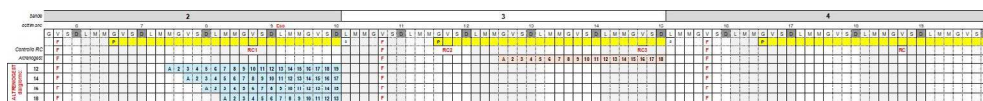
### Disegno della prova

L'obiettivo del presente studio è stato quello di verificare se, in una conduzione a bande pentasettimanale, attraverso l'utilizzo dell'Altrenogest nel contesto delle prime fasi della gestazione, fosse possibile sincronizzare la venuta in calore delle scrofe non gravide all'interno della banda successiva, allungando quindi l'intervallo fra due cicli estrali dai fisiologici 21 giorni ai 35 giorni più compatibili con il sistema della banda implementato.

A partire dal mese di agosto (05/08/25), e per le cinque bande successive (fino al 27/12/25), sono stati scelti in modo casuale quattro gruppi di scrofe da quattro capi ciascuno, per un totale di 80 scrofe (16 scrofe per 5 bande). Da questo contesto sono state escluse le scrofette e le scrofe con problemi sanitari (zoppie, tosse etc). Successivamente all'inseminazione delle scrofe, i 4 gruppi hanno ricevuto un trattamento di Altrenogest 20mg/capo/die a partire rispettivamente dal 12° giorno, 14° giorno, 16° giorno e 18° giorno dall'inseminazione (Figura 3).

Al 24° giorno dall'inseminazione è stata eseguita l'indagine di gravidanza tramite ecografia (ECO 1) con ecografo Sius dotato di sonda elettronica da 5mHz. Alle scrofe gravide è stato sospeso il trattamento, mentre a quelle vuote è stato prolungato fino al giorno precedente lo svezzamento della banda successiva.

Le scrofe che hanno risposto al trattamento sono state incluse nella banda successiva e normalmente stimolate e fecondate al calore manifestato al verro. L'inseminazione è avvenuta tramite metodica post-cervicale. Ventiquattro giorni dopo sono state nuovamente ecografate (ECO 2) per valutare se l'inseminazione fosse andata a buon fine.



**Figura 3:** Schema di inizio e fine del trattamento con Altrenogest per ciascuno dei 4 gruppi della prova (in azzurro). In arancione lo schema di trattamento convenzionale. F: giorno di fecondazione della banda; P: giorno dei parti della banda; S: giorno della svezzata della banda. RC1, RC2 ed RC3 rappresentano il susseguirsi dei ritorni ciclici rispetto alla prima F dello schema. ECO: tempo dell'ecografia relativo all'ECO 1.

**Figure 3:** Start and end schedule of Altrenogest treatment for each of the four trial groups (in blue). The conventional treatment schedule is in orange. F: day of insemination of the batch; P: farrowing day of the batch; S: day of weaning of the batch. RC1, RC2, and RC3 represent the sequence of cyclic returns according with the first F of the schedule. ECO: time of ultrasound scans relative to ECO 1.

Inoltre, è stato fatto un confronto dei giorni improduttivi e dei costi del trattamento con Altrenogest nei vari gruppi, rapportati alla procedura aziendale sino a quel momento adottata per il controllo dei ritoni ciclici.

## RISULTATI

Delle 80 scrofe reclutate per la sperimentazione e trattate con l'Altrenogest, 9 sono risultate vuote all'ecografia dei 24 giorni dalla copertura (ECO 1) e sono distribuite in tabella 2 secondo il gruppo di trattamento.

Gruppi trattamento	F-BD1 05/08/25	F-BD2 13/09/25	F-BD3 18/10/25	F-BD4 22/11/25	F-BD1 27/12/25
12 giorni	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4
14 giorni	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4
16 giorni	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4
18 giorni	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4

**Tabella 2:** Distribuzione delle scrofe vuote all'ecografia relative ai diversi gruppi di trattamento con Altrenogest (12-14-16-18 giorni dall'inseminazione) rispetto al totale delle scrofe trattate per ciascun gruppo all'interno delle 5 bande (BD) con relativa data di inseminazione (F).

**Table 2:** Distribution of not pregnant sows at ultrasound in the different Altrenogest treatment groups (12-14-16-18 days after insemination) compared to the total number of sows treated for each group within the 5 bands (BD) with relative insemination date (F).

Ad eccezione per le 3 scrofe trattate con Altrenogest dal 18° giorno che non sono venute in calore alla fine del trattamento, tutte le altre sono venute in calore, inseminate e diagnosticate gravide al 24° giorno (ECO 2).

Gruppi trattamento	N° di scrofe con calore atteso dopo trattamento/ Vuote ECO-1	N° scrofe gravide ECO-2/ scrofe con calore atteso dopo trattamento
12 giorni	2/2	2/2
14 giorni	2/2	2/2
16 giorni	2/2	2/2
18 giorni	0/3	0/0

**Tabella 3:** Dati relativi al numero di scrofe che sono venute in calore dopo il trattamento con l'Altrenogest rispetto al totale delle scrofe ecografate vuote (ECO 1). Quindi sono state riportate le scrofe gravide all'ecografia (ECO 2) rispetto alle scrofe inseminate al calore successivo al trattamento con Altrenogest.

**Table 3:** Data relating to the number of sows that came into heat after treatment with Altrenogest compared to the total number of sows ultrasounded empty (ECO 1). Therefore, pregnant sows at ultrasound (ECO 2) were compared to sows inseminated at heat following treatment with Altrenogest.

L'analisi economica riportata in tabella 4 visualizza un riepilogo dei costi per ciascun gruppo di trattamento con Altrenogest confrontato con il trattamento convenzionale, ovvero quello abitualmente eseguito in azienda, reperibile nella Tabella 1. Il dato relativo al gruppo dei 18 giorni è stato volutamente omesso visto il 100% di insuccesso a fine trattamento.

Gruppi trattamento	Giorni improduttivi da RC1 a F BD3	Giorni improduttivi da RC1 a F BD4	Costo totale a 3.20€/capo/die	Giorni di trattamento con Altrenogest	Costo totale trattamento (0.50€/capo/die)	Costi totali
12 giorni	14		44.80€	19	9.50€	54.30€
14 giorni	14		44.80€	17	8.50€	53.30€
16 giorni	14		44.80€	15	7.50€	52.30€
Gestione convenzionale		49	156.80€	18	9.00€	165.80€

**Tabella 4:** Confronto economico dei gruppi trattamento con Altrenogest a 12, 14 e 16 giorni dall'inseminazione. Sono stati separati i costi dei giorni improduttivi (3,20€/capo/die da SIP Consultors 2026) e quelli del Altrenogest 0,50€/capo/die.

**Table 4:** Economic comparison of the Altrenogest treatment groups at 12, 14, and 16 days after insemination. The costs of unproductive days (€3.20/sow/day from SIP Consultors 2026) and those of Altrenogest (€0.50/sow/day) were separated.

Nella tabella 5 viene proposta una simulazione dei costi da sostenere in funzione di un differente tasso di fertilità ecografica confrontati con i costi già abitualmente sostenuti dall'azienda con il trattamento convenzionale. Per semplicità è stato fatto un confronto su 100 inseminazioni valutando i costi di un contesto aziendale più modesto, con l'80% di fertilità ecografica, ed uno più virtuosi con il 90%.

Gestione dei ritorni con Altrenogest	Con l'80% di fertilità	Totale costi	Col 90% di fertilità	Totale costi
Totale IA	100♀		100♀	
Vuote eco	20♀		10♀	
Gravide	80♀		90♀	
Trattamento con Altrenogest dal 16°gg→ECO1	100♀x0,50€x9gg	450,00€	100♀x0,50€x9gg	450,00€
Trattamento con Altrenogest da ECO 1→S BD3	20♀x0,50€x6gg	60,00€	10♀x0,50€x6gg	30,00€
Giorni improduttivi delle 20♀	20♀x3,20€x9gg	576,00€	10♀x3,20€x9gg	288,00€
<b>Totale</b>		<b>1.086,00€</b>		<b>768,00€</b>
Gestione dei ritorni convenzionale				
Giorni improduttivi	20♀x3,20€x49gg	3.136,00€	10♀x3,20€x49gg	1.568,00€
Trattamento con Altrenogest	20♀x0,50€x18gg	180,00€	10♀x0,50€x18gg	90,00€
<b>Totale</b>		<b>3.316,00€</b>		<b>1.658,00€</b>

**Tabella 5:** Confronto economico sui costi legati ai due differenti approcci, con Altrenogest e convenzionale, in aziende con l'80% ed il 90% di fertilità ecografica. I calcoli relativi alla gestione dei ritorni convenzionali sono ricavabili più nel dettaglio dalla tabella 1.

**Table 5:** Economic comparison of the costs associated with the two different approaches, with Altrenogest and conventional, in companies with 80% and 90% ultrasound-based fertility. The calculations relating to the management of conventional returns can be found in more detail in Table 1.

Per dare completezza ai conti economici, abbiamo dato un valore anche alla mancata produzione. Il gruppo trattato in maniera convenzionale ha evidenziato 35 giorni improduttivi in più rispetto al gruppo trattato con l'Altrenogest. Dal momento che l'azienda si trova nella condizione di svezzare 26 suinetti/scrofa produttiva/anno, che equivalgono a 0,071 suinetti svezzati al giorno. Moltiplicando questo valore per i 35 giorni improduttivi otteniamo che nelle scrofe trattate in maniera convenzionale la produzione è ridotta di 2,49 suinetti all'anno, con un danno economico di circa 100 € a scrofa.

<b>Mancata produzione sui gg improduttivi</b>		
	<b>Altrenogest</b>	<b>Convenzionale</b>
<b>gg improduttivi</b>	0	35
<b>svezzati /scrofa /produttiva/anno (aziendale)</b>	26	23,51
<b>svezzati/giorno (svezzati/anno/365)</b>	0,071	0,064
<b>valore economico svezzato €</b>	37,00	
<b>importo/anno € (svezzati/anno * valore svezzato)</b>	962,00	869,75

**Tabella 6:** Calcolo della mancata produzione partendo dai giorni improduttivi.

**Table 6:** Calculation of lost production starting from unproductive days.

## DISCUSSIONE

Vale subito la pena di sottolineare che il ridotto numero di campioni ottenuto da questo studio, limita le considerazioni finali anche se i risultati preliminari sembrano molto promettenti. Inoltre, numerosi sono i dati che sarebbe stato interessante acquisire come: il rapporto della fertilità fra le scrofe trattate in maniera convenzionale rispetto alla fertilità ricavata del gruppo trattato con l'Altrenogest. Infatti, nelle scrofe, il ritorno in estro dopo l'inseminazione rappresenta una forma di insuccesso riproduttivo associata a un peggioramento delle performance nelle inseminazioni successive (Castagna et al., 2008). Questo fenomeno è attribuito alla presenza di sub-fertilità intrinseca, disfunzioni endocrine e possibili alterazioni uterine subcliniche che sarebbe utile esplorare. Inoltre, molto interessanti sarebbero stati anche i dati della portata al parto dei due gruppi nonché il confronto fra i dati della natalità e del peso alla nascita, così come il comportamento delle scrofette sottoposte al trattamento con Altrenogest piuttosto che una valutazione anche sulle scrofe problematiche. Per tutte queste ragioni il presente contributo lascia spazio ad ulteriori approfondimenti che ne fanno ben capire il potenziale.

Tuttavia, il primo aspetto che si evince dal nostro studio è che la somministrazione dell'Altrenogest a partire dal 12°, 14° e 16° giorno dalla inseminazione di scrofe svezzate, si è rilevato efficace nel 100% (6/6) dei casi nell'impedire la venuta in calore fra i 18 ed i 24 giorni (RC1) delle scrofe non rimaste gravide. Inoltre, una volta completato il trattamento con l'Altrenogest, tutte le scrofe ecograficamente vuote all'ECO 1 sono venute in calore (6/6) allungando di fatto l'intervallo fra due cicli consecutivi a 35 giorni e non 21, come fisiologicamente atteso. Infine, sempre nel 100% (6/6) dei casi, è stato possibile inseminare i calori così ottenuti confermandone l'avvenuto concepimento per via ecografica a 24 giorni (ECO 2).

Relativamente al gruppo dove la somministrazione dell'Altrenogest è avvenuta a partire dal 18° giorno dall'inseminazione nessuna scrofa ha risposto al trattamento (0/3). Questa situazione trova conferma dalla bibliografia dove Flowers (2015) sottolinea che l'efficacia dell'Altrenogest è strettamente dipendente dalla fase del ciclo estrale al momento dell'inizio

del trattamento. Durante la fase luteinica, l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio è già sottoposto a feedback negativo da parte del progesterone endogeno; in questo contesto l'Altrenogest agisce come fattore di mantenimento della soppressione gonadotropica, prolungando artificialmente la fase luteale e prevenendo la ripresa dell'attività follicolare.

Al contrario, nella fase follicolare avanzata, l'aumento della frequenza pulsatile dell'LH e l'elevata produzione di estradiolo da parte dei follicoli dominanti possono aver già innescato i meccanismi neuroendocrini che conducono al picco preovulatorio di LH. In tale condizione, l'effetto inibitorio del progestinico può risultare parziale o inefficace (Foxcroft, 1985; Knox, 2001), come nel caso delle 3 scrofe trattate dal 18° giorno del nostro studio, poiché il processo ovulatorio era già funzionalmente avviato e meno suscettibile al feedback negativo.

Come ben risaputo, la fase follicolare si innesca al termine della fase luteinica ed in assenza del segnale di gravidanza di origine embrionale nel "talking" fra embrione e scrofa. Questo segnale è costituito principalmente da estrogeni prodotti dagli embrioni che bloccano l'enzima convertitore delle PGE2 (luteotrofiche) di derivazione uterina, in PGF2a (luteolitiche) reindirizzando quelle che comunque si formano all'interno dell'utero così da impedirne una loro immissione nel torrente circolatorio e di conseguenza il loro effetto sull'ovaio (Christenson et al. 1994). Vine di conseguenza che, somministrando l'Altrenogest in piena fase luteinica, potremmo mantenere lo stato luteinico anche in assenza del segnale di gravidanza, poiché sarebbe perpetuata la dominanza della fase luteinica attraverso la somministrazione iatrogena dell'Altrenogest.

Quindi il punto nevralgico risulta quello legato al momento della somministrazione dell'Altrenogest visto che dovrebbe avvenire il più tardi possibile rispetto all'inseminazione per contenerne i costi farmacologici, ma ancora nella fase luteinica per evitare che la luteolisi endogena abbia permesso la riattivazione del ciclo ovarico. È infatti documentato che nel ciclo estrale della scrofa il corpo luteo neoformato sia in grado di rispondere alla PGF $\alpha$  solo nella fase luteale media e la luteolisi può essere indotta efficacemente solo dopo circa il giorno 12 del ciclo estrale con piena risposta tra il 13° ed il 14° giorno, quando inizia la luteolisi fisiologica indotta dalle prostaglandine uterine. Prima di tale momento, il corpo luteo risulta funzionalmente refrattario agli stimoli luteolitici, probabilmente a causa di meccanismi intraluteali protettivi mediati dal progesterone e da fattori paracrini locali (Diaz et al., 2011; Gadsby et al., 2006).

A conferma di tutto ciò, è possibile affermare che nel nostro studio il trattamento con l'Altrenogest a partire dal 12°, 14° o 16° giorno dalla fecondazione gli effetti di soppressione dell'attività gonadotropica sono i medesimi. Interessante osservare che, con ogni probabilità, il trattamento a 16 giorni, sebbene a luteolisi già avviata, è ancora in una fase di non dominanza follicolare cosa che consente l'attività di soppressione esercitata dall'Altrenogest sull'ipotalamo e sull'ipofisi in grado di bloccare venuta in calore dell'animale.

Anche per quanto riguarda i conti economici è necessario apporre alcune postille legate sia alla difficoltà dei calcoli in sé, e sia alla particolarità del sistema di banda che, essendo pentasettimanale, rende tre bande su quattro sovrapponibili ai dati che abbiamo proposto, ma una su quattro leggermente diversa (ma più penalizzante). In ogni caso è possibile affermare che in un contesto di basse prestazioni di fertilità ecografica (80%) i costi totali dei giorni improduttivi più trattamento ormonale nel gruppo convenzionale sono indicativamente tre volte i superiori a quelli del gruppo trattato con l'Altrenogest (3.316,00€ vs 1.086,00€) ed anche per aziende con fertilità più virtuose (90%), il costo rimane doppio ponendosi come valida alternativa al plausibile approccio della riforma dei ritoni (1.658,00€ vs 768,00€). Anche il numero degli svezzati/scrofa/anno risulta migliorato nel gruppo trattato con Altrenogest rispetto al gruppo convenzionale attestandosi, dipendentemente dalle prestazioni dell'azienda, attorno ai 100,00€/scrofa di ritorno trattata.

## CONCLUSIONI

Il tema della somministrazione dell'Altrenogest durante la gestazione è relativamente poco esplorato da qui le potenzialità di implementazione del presente studio. La supplementazione con altrenogest nelle prime fasi della gestazione (circa 6–12 giorni) è stata associata a un miglioramento di alcuni parametri riproduttivi, tra cui un aumento del numero totale di suinetti nati e dei nati vivi, probabilmente attraverso un miglioramento della funzione endometriale e dell'ambiente uterino che favorisce lo sviluppo embrionale e la crescita placentare (Vasconcelos, 2022). Inoltre, l'utilizzo dell'Altrenogest nelle fasi finali della gestazione è stato studiato come strumento per la modulazione della durata della gravidanza e la sincronizzazione del parto visto che può ritardare la luteolisi e posticipare l'inizio della cascata endocrina che porta all'innesco del parto (Taechamaeteekul et al. 2022). Quello che riteniamo venga apportato di interessante da nostro studio è un possibile contributo per migliorare il management della gestione dei ritorni in aziende con management a banda pentasettimanale laddove la criticità è legata alla asincronia fra fisiologia del ciclo riproduttivo della scrofa (21 giorni) ed il ritmo di produzione della banda (in copertura ogni 5 settimane).

Dal nostro studio preliminare sembra che la somministrazione di Altrenogest fra il 14° ed il 16° giorno dall'inseminazione, possa essere sufficiente per impedire la fisiologica comparsa dei ritorni in ciclo fra i 18-24 giorni. In questo contesto risulta fondamentale il ruolo dell'ecografia che permette di rilevare le scrofe vuote sospendendo il trattamento delle scrofe gravide, con notevole risparmio di farmaco, ed allo stesso tempo di prolungare il trattamento con Altrenogest sulle scrofe con esito ecografico negativo sino allo svezzamento della banda successiva.

Notevoli sembrano i vantaggi manageriali ed economici legati ai circa 35 giorni improduttivi risparmiati sulle scrofe trattate con Altrenogest rispetto a quelle gestite in maniera convenzionale: flussi maggiormente rispettati e riduzione della riforma per improduttività; un risparmio di circa il 66% sui costi dei giorni improduttivi e del farmaco; maggiore produzione di suinetti per le scrofe trattate rispetto a quelle gestite in maniera convenzionale (circa 100,00€/scrofa trattata). Nel complesso, è possibile affermare che gli effetti della somministrazione dell'Altrenogest durante la gravidanza della scrofa sembrano avere ancora delle potenzialità da esplorare. Pertanto, una migliore comprensione delle interazioni tra supplementazione progestinica, funzione endometriale e sviluppo del conceptus potrebbe rappresentare un elemento chiave per ottimizzare le strategie di gestione riproduttiva nella specie suina.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baumert DA. (2017). 020 Batch farrowing as a health strategy in modern pork production systems. <https://doi.org/10.2527/asasmw.2017.020>.
2. Bown P (2006). Advantages and disadvantages of batch farrowing. *Farm Animal Practice* 28, 94–96
3. Castagna CD, Peixoto CH, Bortolozzo FP, Wentz I, Neto GB, Ruschel F. (2008) Reproductive performance of swine females re-serviced after return to estrus or abortion. *Animal Reproduction Science*. 2008;106:305-312.
4. Christenson LK, Farley DB, Anderson LH, Ford SP (1994) Luteal maintenance during early pregnancy in the pig: role for prostaglandin E2. *Prostaglandins* 1994; 47:61-75
5. Diaz FJ, Luo W, Wiltbank MC. (2011) Effect of decreasing intraluteal progesterone on sensitivity of the early porcine corpus luteum to the luteolytic actions of prostaglandin F2 $\alpha$ . *Biology of Reproduction*. 2011;84:26-33.
6. Estienne MJ, Harper AF. (2013) Control of estrus in gilts. *Anim. Reprod. Sci.*138(3–4):281–289
7. Flowers WL. (2015) Management of gilt development and estrus synchronization. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 31(1):1–10

8. Foxcroft GR, Hunter MG. (1985) Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 33:1–19
9. Gadsby JE, Lovdal JA, Britt JH, Fitz TA. (2006) The role of intra-luteal factors in the control of the porcine corpus luteum. *Reproduction Supplement.* 2006;62:187-200.
10. Kingston N. (2004). Health Upgrades. Disease Reduction Strategies for Finishing Herds. The Natwest/Rac Annual Fellowship in strategic development of the UK pig industry, 36.
11. Knox RV, Rodriguez-Zas SL, Miller GM, Willenburg KL, Robb JA.(2001) Administration of Altrenogest to gilts during follicular development: effects on ovarian function and subsequent fertility. *Theriogenology.* 55(5):1091–1104.
12. Knox RV. (2015) Altrenogest in swine reproduction. *Theriogenology.* 84(9):1469–1474
13. 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.
14. Mazzoni C, Scollo A. (2024) “La banda pentasettimanale: una terapia zootecnica” XLIX atti SIPAS, Desenzano (BS), 18-19 Aprile 2024; p. 160-169
15. Mekerke B, Leneveu P. (2006). Modifications de conduite de bandes et impact sur la situation sanitaire: analyse de quelques exemples. *Proc. Association Française de Médecine Veterinaire Porcine*, Toulouse, France, pp. 49–64
16. Rix M, Ketchen R. (2016) Batch farrowing interest grows with demand for larger groups of weaned pigs. *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
17. Taechamaeteekul P, Tummaruk P. (2022) Effect of altrenogest administration in late gestation on farrowing synchronization and piglet performance. *Theriogenology.* 2022;183:85-92.
18. Tonon F. (2008) La gestione delle scrofe in bande. *Large Animal Review*, 29-32
19. 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
20. Vasconcelos JL, Martins SM, Ferreira A. (2022). Effects of altrenogest supplementation during early pregnancy on reproductive performance of sows. *Animals (Basel).* 2022;12:2012.

# VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE IN RELAZIONE AI PROTOCOLLI DI BIOSICUREZZA INTERNA ADOTTATI NELLE PRATICHE VACCINALI NELLA SCROFA

## *EVALUATION OF REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN RELATION TO INTERNAL BIOSECURITY PROTOCOLS ADOPTED IN SOW VACCINATION PRACTICES*

CAIMMI D<sup>1</sup>., SCOLLO A<sup>2</sup>., MAZZONI C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Suivet sas, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia;*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO)*

**Parole chiave:** Biosicurezza, Vaccini, Scrofa

**Key Words:** Biosecurity, Vaccines, Sow

### **Riassunto**

Questo studio di campo ha valutato l'impatto di diversi livelli di biosicurezza interna applicati durante le procedure di vaccinazione in gestazione sulle performance riproduttive in un allevamento intensivo a ciclo chiuso (Farrow-to-finish) situato nel Nord Italia. Sono stati inclusi tre lotti produttivi consecutivi, per un totale di 484 scrofe; dopo l'esclusione dei soggetti non gravidi, 427 animali gestanti sono stati mantenuti per l'analisi statistica.

Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi sperimentali differenziati esclusivamente per la gestione della vaccinazione: protocollo tradizionale (un ago per box, senza cambio delle calzature), biosicurezza intermedia (ago monouso per ogni scrofa) e biosicurezza elevata (ago monouso per ogni scrofa più cambio sistematico dei copri stivali tra i box). Sono stati registrati il tasso di parto, il numero di nati vivi, nati morti, feti mummificati, totale nati e suinetti svezzati. Il tasso di parto è risultato significativamente più elevato nel gruppo ad alta biosicurezza rispetto al protocollo tradizionale ( $P < 0,05$ ), mentre non sono state osservate differenze significative nei parametri di prolificità. La lunghezza cranio-groppo dei feti mummificati è risultata inferiore nel gruppo tradizionale. Tutti i campioni di fluido orale e di tessuto sono risultati negativi per PRRSV.

Questi risultati suggeriscono che l'adozione di misure più rigorose di biosicurezza interna durante le procedure vaccinali possano ridurre le perdite gestazionali e migliorare la stabilità riproduttiva in condizioni commerciali di campo.

### **Abstract**

This field study evaluated the impact of different levels of internal biosecurity applied during gestational vaccination procedures on reproductive performance in an intensive farrow-to-finish sow farm located in Northern Italy. Three consecutive production batches were included, for a total of 484 sows, with 427 pregnant animals retained for statistical analysis after exclusion of non-pregnant subjects.

Animals were allocated into three experimental groups differing exclusively in vaccination management: traditional protocol (one needle per pen, no footwear change), intermediate biosecurity (single-use needle per sow), and high biosecurity (single-use needle plus systematic boot cover change between pens). Farrowing rate, live-born piglets, stillborn piglets, mummified fetuses, total born and weaned piglets were recorded. Farrowing rate was significantly higher in the high-biosecurity group compared with the traditional protocol ( $P < 0.05$ ), whereas no significant differences were observed in prolificacy traits.

Crown–rump length of mummified fetuses was lower in the traditional group. All oral fluid and tissue samples tested negative for PRRSV. These results suggest that stricter internal biosecurity during vaccination procedures may reduce gestational losses and improve reproductive stability under commercial field conditions.

## INTRODUZIONE

Le malattie infettive rappresentano una delle principali determinanti della variabilità produttiva negli allevamenti suinicoli intensivi, incidendo in modo significativo sulla stabilità sanitaria, sull'efficienza riproduttiva e sulla sostenibilità economica delle aziende. Nei sistemi a ciclo chiuso, caratterizzati da elevata densità animale e continuità dei flussi produttivi, anche modeste alterazioni dell'equilibrio sanitario possono determinare conseguenze rilevanti sul piano riproduttivo, in particolare nei reparti di gestazione e maternità, dove la sensibilità biologica degli animali e l'impatto economico delle perdite risultano particolarmente elevati. Tra le patologie a maggiore impatto nei nuclei da riproduzione, la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) costituisce un modello emblematico di malattia caratterizzata da ampia diffusione, elevata trasmissibilità e marcato impatto sulle performance riproduttive (Jeffrey J. Zimmerman et al., 2019). Il PRRS virus (PRRSV), appartenente alla famiglia *Arteriviridae*, è un virus a RNA dotato di elevata variabilità genetica e capacità di persistenza nell'ospite. Nei reparti di gestazione e maternità, l'infezione è associata a ritorni in calore, aborti tardivi, aumento dei nati morti e dei feti mummificati, riduzione del numero di suinetti svezzati per scrofa/anno e incremento della mortalità neonatale (Jeffrey J. Zimmerman et al., 2019). L'impatto economico della PRRS è stato stimato in centinaia di milioni di euro annui nei principali paesi produttori, a causa della combinazione tra perdite riproduttive, incremento dei costi sanitari e riduzione dell'efficienza produttiva (Jeffrey J. Zimmerman et al., 2019).

La trasmissione del PRRSV può avvenire attraverso molteplici vie: contatto diretto tra animali, aerosol a breve e media distanza, seme infetto e trasmissione indiretta mediante fomite contaminati (Pileri & Mateu, 2016). In particolare, la trasmissione meccanica iatrogena attraverso aghi contaminati durante pratiche sanitarie è stata dimostrata sperimentalmente, evidenziando come il riutilizzo di dispositivi iniettabili possa facilitare la diffusione intra-allevamento del virus (Dee et al., 2002) mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV. Studi successivi hanno confermato che anche personale, indumenti e calzature possono fungere da vettori passivi in grado di trasportare particelle virali tra reparti in assenza di adeguate misure di contenimento (Pitkin et al., 2009).

Tali evidenze hanno contribuito a rafforzare il concetto secondo cui la sola vaccinazione, pur rappresentando uno strumento fondamentale nel controllo delle malattie infettive, non è sufficiente a garantire la stabilità sanitaria in assenza di adeguate misure di biosicurezza (Pileri & Mateu, 2016). La biosicurezza interna può essere definita come l'insieme delle misure strutturali, gestionali e comportamentali volte a limitare la diffusione degli agenti patogeni già presenti all'interno dell'allevamento, attraverso il controllo dei flussi di animali, persone, materiali e attrezzature. Nei sistemi intensivi a ciclo chiuso, la gestione dei flussi interni e la prevenzione della contaminazione crociata tra box e reparti rappresentano elementi determinanti per la riduzione della pressione infettiva complessiva.

Tra le procedure operative routinarie, le vaccinazioni in gestazione assumono particolare rilevanza. Esse comportano la manipolazione seriale di un elevato numero di scrofe in tempi ristretti, con movimentazione del personale tra box differenti e utilizzo ripetuto di dispositivi iniettabili. In assenza di protocolli rigorosi di sostituzione dell'ago e di gestione delle calzature o dei dispositivi di protezione individuale, tale momento operativo può costituire un potenziale fattore di diffusione indiretta di agenti patogeni. In presenza di infezioni subcliniche o di

patogeni circolanti a bassa intensità, anche una limitata trasmissione meccanica potrebbe contribuire ad aumentare la variabilità riproduttiva e le perdite gestazionali. Nonostante la possibilità biologica del fenomeno e le evidenze sperimentali disponibili sulla trasmissione meccanica, risultano ancora limitati gli studi di campo che abbiano valutato in condizioni commerciali reali l'impatto di differenti livelli di biosicurezza interna applicati durante le procedure vaccinali sugli esiti riproduttivi delle scrofe. In particolare, appare scarsamente indagata la relazione tra gestione operativa delle pratiche iniettive e parametri quali portata al parto, numero di nati vivi, natimortalità e incidenza di mummificazioni fetali. Alla luce di tali considerazioni, il presente studio si propone di valutare l'effetto di tre protocolli operativi caratterizzati da differente rigore nella gestione di aghi e calzature durante le vaccinazioni in gestazione, analizzandone l'impatto sulle performance riproduttive in un allevamento intensivo a ciclo chiuso della Pianura Padana. L'obiettivo è fornire evidenze applicative utili a integrare le strategie vaccinali con standard operativi più rigorosi di biosicurezza interna, contribuendo al miglioramento della stabilità sanitaria e produttiva negli allevamenti suinicoli da riproduzione.

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato condotto tra novembre 2024 e maggio 2025 in un allevamento convenzionale a ciclo semi-chiuso situato in Pianura Padana, specializzato nella produzione di suini destinati al Prosciutto di Parma DOP. Il sistema produttivo è semichiuso, in quanto una quota dei suinetti viene trasferita presso siti esterni per le successive fasi di svezzamento e ingrasso, rispettivamente localizzati a circa 11 km e 36 km dall'azienda principale.

La consistenza aziendale comprende circa 700 scrofe di genetica ibrida olandese con rimonta esterna programmata con cadenza bimestrale. Le scrofette di rimonta vengono accasate in una struttura dedicata, fisicamente separata dal reparto di gestazione, al fine di garantire una gestione sanitaria differenziata. Complessivamente sono presenti circa 2.500 suinetti svezzati, 2.000 magroni e 3.500 suini all'ingrasso.

Il management riproduttivo è organizzato a bande penta-settimanali con svezzamento a 24 giorni. Le scrofe in gestazione sono stabulate in box collettivi da 8 a 15 capi, con pavimentazione piena e corridoio di defecazione esterno, le recinzioni interne ed esterne sono in muratura piena. Il flusso di movimentazione delle scrofe segue un percorso standardizzato dallo svezzamento alla copertura, alla gestazione e al successivo trasferimento in sala parto, nel rispetto delle normative vigenti in materia di benessere animale e biosicurezza.

L'alimentazione è garantita dal mangimificio aziendale interno. In gestazione la distribuzione dell'alimento avviene tramite impianto semi-automatizzato a bagnato, mentre in sala parto la somministrazione è manuale con due pasti giornalieri. Le curve alimentari sono fornite dalla casa genetica di riferimento e periodicamente rivalutate dai consulenti tecnici.

Lo stato sanitario del sito è definibile convenzionale, con positività per PRRSV, virus influenzali e PCV2, oltre alla presenza di patogeni batterici respiratori ed enterici.

Lo studio ha coinvolto tre bande consecutive per un totale iniziale di 484 scrofe, selezionate secondo la normale programmazione aziendale. Sono state escluse dall'analisi le scrofe negative alla diagnosi ecografica di gravidanza o trasferite in infermeria durante la gestazione, ottenendo un totale finale di 427 scrofe gravide.

All'interno di ciascuna banda le scrofe sono state suddivise in tre gruppi sperimentali omogenei per numero e ordine di parto, mantenendo invariata la composizione per tutta la durata dello studio e garantendo la presenza di almeno un box di scrofette per gruppo. I gruppi differivano esclusivamente per le modalità operative adottate durante le vaccinazioni in gestazione. Il Gruppo 1 (protocollo tradizionale) prevedeva l'utilizzo dello stesso ago per tutte le scrofe all'interno del box. Il Gruppo 2 (biosicurezza intermedia) prevedeva l'utilizzo

di aghi monouso sostituiti per ogni animale. Il Gruppo 3 (biosicurezza elevata) prevedeva sia l'utilizzo di aghi monouso per ogni scrofa sia il cambio sistematico dei copri-calzari tra box. Tutte le altre condizioni gestionali, ambientali, nutrizionali e sanitarie sono rimaste invariate. Durante il periodo di studio è stato mantenuto il piano vaccinale aziendale routinario, documentato tramite schede operative affisse nei reparti e non modificato ai fini sperimentali. Per le scrofe e le scrofette gestanti, il protocollo prevedeva interventi distinti e temporalmente scaglionati in funzione dello stadio di gestazione. In particolare, la vaccinazione contro l'influenza suina veniva effettuata intorno agli 80 giorni di gestazione, mentre la vaccinazione contro *Streptococcus suis* era programmata a 90 giorni di gestazione. Successivamente, intorno ai 100 giorni di gestazione, veniva somministrato un vaccino bivalente contro *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella typhimurium*, completando il ciclo vaccinale previsto per le scrofe pluripare gestanti. Nelle scrofette, oltre al protocollo previsto per le pluripare, era prevista la somministrazione di un vaccino polivalente contro Rotavirus, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* tipo C. intorno ai 90 giorni di gestazione. Parallelamente ai protocolli di gestazione, l'azienda adottava vaccinazioni periodiche di massa sull'intera mandria. In particolare, la vaccinazione contro PRRSV veniva effettuata con cadenza trimestrale mediante vaccini vivi attenuati, mentre la vaccinazione contro PCV2 era programmata con cadenza semestrale, al fine di mantenere una copertura immunitaria costante nel tempo.

Per ciascuna scrofa sono stati registrati i principali parametri riproduttivi al parto: nati vivi, nati morti, feti mummificati, mortalità perinatale e numero di suinetti svezzati. I feti mummificati sono stati identificati su base morfologica e ne è stata misurata la lunghezza cranio-caudale mediante calibro, al fine di stimare l'epoca gestazionale al momento del decesso.

Parallelamente sono stati effettuati campionamenti di fluido orale mediante corde da masticazione posizionate nei box, per un totale di 18 campioni complessivi (due per ciascuno dei tre gruppi per ciascuna delle tre bande). Il fluido orale è stato raccolto mediante spremitura manuale e conferito all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna per l'analisi molecolare mediante PCR per PRRSV. Sono stati inoltre analizzati sei pools di siero testicolare provenienti da suinetti neonati, come monitoraggio sanitario complementare della mandria. I pools, in numero di 6, sono stati costituiti raggruppando i testicoli dei suinetti maschi, provenienti da 10 covate ciascuno, della stessa banda, al fine di ottenere una valutazione rappresentativa a livello di gruppo. Il tessuto testicolare neonatale è comunemente impiegato nei programmi di sorveglianza per la ricerca di PRRSV, in quanto consente di evidenziare eventuale infezione congenita e di monitorare indirettamente la circolazione virale nella scrofaia durante la fase finale della gestazione (Jeffrey J. Zimmerman et al., 2019).

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante software XLSTAT (versione 2025.1). I dati sono stati sottoposti a controllo preliminare di completezza; le osservazioni incomplete sono state escluse. In assenza di distribuzione normale delle variabili, sono stati applicati test non parametrici (Kruskal–Wallis) per il confronto dei parametri produttivi e delle misurazioni morfometriche tra gruppi, mentre il tasso di parto è stato analizzato mediante test  $\chi^2$ .

## RISULTATI

Nel periodo di studio sono stati analizzati i dati relativi a tre bande consecutive di scrofe, per un totale iniziale di 484 animali, successivamente suddivisi nei gruppi sperimentali in base ai criteri previsti dal protocollo di studio. La prima banda, costituita da 163 scrofe, comprendeva 12 soggetti risultati negativi all'ecografia e 4 scrofe risultate negative al parto, che non sono state incluse nell'analisi dei gruppi sperimentali; le restanti scrofe sono state suddivise nel Gruppo 1 (47 scrofe), Gruppo 2 (49 scrofe) e Gruppo 3 (50 scrofe). La seconda banda, composta da 162 scrofe, presentava 14 soggetti negativi all'ecografia e 4 scrofe trasferite in

infermeria durante la gestazione, non considerate nell'analisi; le scrofe restanti sono state distribuite nel Gruppo 1 (47 scrofe), Gruppo 2 (45 scrofe) e Gruppo 3 (52 scrofe). La terza banda, costituita da 159 scrofe, includeva 17 soggetti risultati negativi all'ecografia e 5 scrofe trasferite in infermeria, anch'esse escluse dall'analisi; le restanti scrofe sono state assegnate al Gruppo 1 (41 scrofe), al Gruppo 2 (48 scrofe) e al Gruppo 3 (48 scrofe). Complessivamente, l'analisi dei risultati riproduttivi è stata quindi condotta su 427 scrofe gravide, suddivise nei tre gruppi sperimentali come segue: Gruppo 1: 135 scrofe, Gruppo 2: 142 scrofe e Gruppo 3: 150 scrofe (*Grafico 1*), valori riportati anche nel grafico riassuntivo della distribuzione dei soggetti nei gruppi sperimentali.

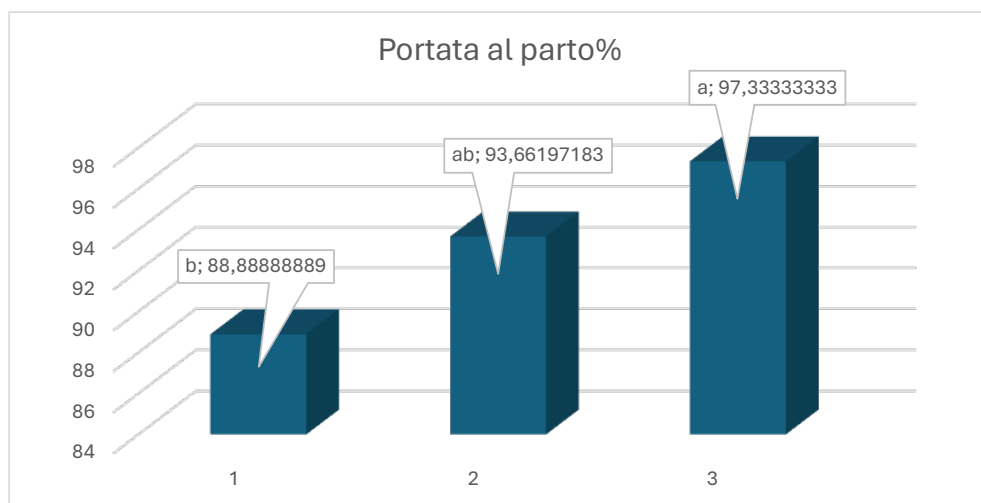


**Grafico 1:** grafico riguardante la divisione in percentuale per i tre gruppi della popolazione presa in esame

**Graph 1:** *Percentage distribution of the study population among the three experimental groups.*

Analizzando la distribuzione complessiva delle scrofe nelle tre bande, la percentuale di soggetti esclusi dall'analisi per esito negativo dell'ecografia o trasferimento in infermeria è risultata relativamente contenuta e sostanzialmente uniforme tra le bande considerate, contribuendo a mantenere una composizione dei gruppi sperimentali comparabile nel tempo. In particolare, il numero totale di scrofe escluse per mancata gravidanza o condizioni cliniche è risultato pari a 56 soggetti sull'intera popolazione iniziale (11,6%), mentre la distribuzione finale degli animali nei tre gruppi sperimentali ha mantenuto una sostanziale omogeneità numerica, riducendo il rischio di distorsioni legate a differenti dimensioni campionarie tra i gruppi.

La portata al parto, espressa come percentuale di scrofe che hanno portato a termine la gestazione, ha mostrato valori statisticamente differenti tra i gruppi considerati (*Grafico 2*). In particolare, il Gruppo 1 ha presentato una portata al parto pari all'88%, mentre valori più elevati sono stati osservati nel Gruppo 2 e nel Gruppo 3. Il confronto ha evidenziato l'assenza di differenze tra il Gruppo 1 e il Gruppo 2, così come tra il Gruppo 2 e il Gruppo 3, mentre è emersa una differenza tra il Gruppo 1 e il Gruppo 3.



**Grafico 2:** rappresentazione della portata al parto espressa in percentuale. A lettere differenti corrispondono differenze di significatività statistica.

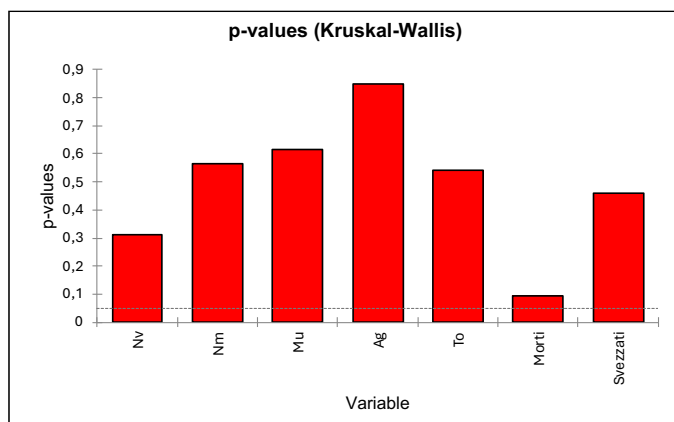
**Graph 2:** Farrowing rate expressed as percentage. Different letters denote statistically significant differences between groups.

Gruppo	Gruppo	p-value
1	2	ns
1	3	0,0089
2	3	ns

**Tabella 1:** p-values della portata parto, confronto tra gruppi. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di  $p < 0,05$ .

**Table 1:** P-values for farrowing rate comparisons among groups. Results were considered statistically significant for  $P < 0.05$ .

I risultati completi del confronto tra i gruppi, sono riportati nella tabella 1. Per quanto riguarda i parametri produttivi, il confronto tra i tre gruppi sperimentali è stato effettuato mediante test di Kruskal–Wallis, ed i risultati sono riportati nel grafico 3. Nel grafico sono rappresentati i valori relativi alle variabili considerate, comprendenti nati vivi (Nv), nati morti (Nm), feti mummificati (Mu), suinetti aggiunti (Ag), totale nati (To), mortalità complessiva (Morti) e numero di suinetti svezzati (Svezzati); tutti i valori osservati non risultano statisticamente differenti fra loro. I valori medi dei parametri riproduttivi per ciascun gruppo sperimentale sono riportati nella Tabella 2. L'osservazione dei dati evidenzia un andamento complessivamente sovrapponibile tra i tre gruppi per quanto riguarda nati vivi, nati morti, numero totale di nati, mortalità complessiva e numero di suinetti svezzati, senza variazioni evidenti tra i diversi livelli di biosicurezza applicati durante le procedure vaccinali. Nel grafico 3 viene rappresentata la tabella 2 riportando complessivamente il confronto dei risultati produttivi tra i gruppi per tutte le variabili considerate.



**Grafico 3:** in ascissa vengono mostrate le variabili; in ordinata sono mostrati i valori di p-value. La linea tratteggiata orizzontale indica il valore p-value  $P < 0,05$ .

**Graph 3:** Variables are shown on the x-axis, while P-values are displayed on the y-axis. The horizontal dashed line indicates the significance threshold ( $P < 0.05$ ).

	gruppo 1	gruppo 2	gruppo 3
Nv	14,608 ± 3,511	14,120 ± 4,246	13,836 ± 4,262
Nm	1,900 ± 2,402	2,000 ± 2,474	2,000 ± 2,421
Mu	0,383 ± 0,852	0,323 ± 0,754	0,260 ± 0,599
Ag	1,992 ± 3,670	2,571 ± 4,665	1,753 ± 3,237
To	2,783 ± 4,175	2,489 ± 4,159	2,281 ± 3,721
Morti	2,550 ± 2,340	3,180 ± 2,777	2,733 ± 2,656
Svezzati	11,267 ± 3,830	11,023 ± 3,999	10,575 ± 4,216

**Tabella 2:** valori medi ± deviazione standard delle variabili nei tre gruppi

**Table 2:** Mean values ± standard deviation of the variables in the three experimental groups.

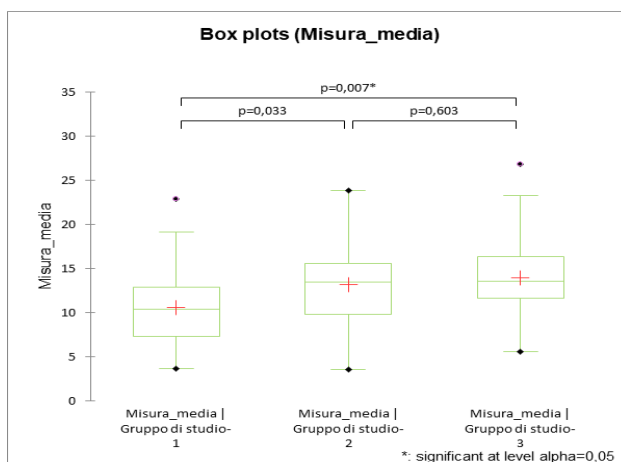
Per quanto riguarda le caratteristiche dei feti mummificati, non è stata messa in evidenza nessuna differenza sul numero dei feti mummificati fra ciascun gruppo della prova. È stata effettuata un'analisi delle misurazioni cranio-caudali medie nei tre gruppi sperimentali.

Gruppo di studio-1	10,610 ± 4,604
Gruppo di studio-2	13,162 ± 4,914
Gruppo di studio-3	13,958 ± 5,054

**Tabella 3:** misura media ± deviazione standard della lunghezza dei suinetti mummificati

**Table 3:** Mean ± standard deviation of crown-rump length of mummified piglets.

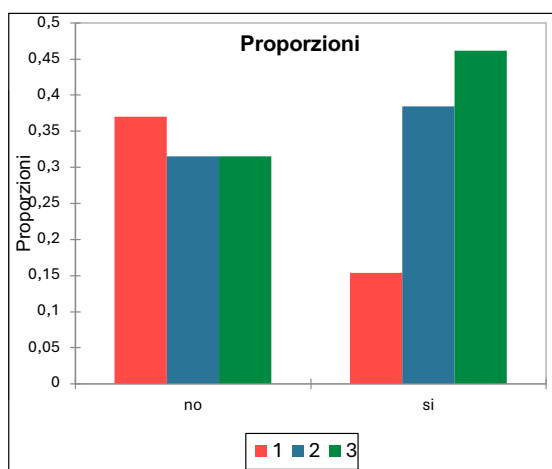
I risultati sono riportati nel box-plot di confronto tra gruppi (*Grafico 4*), nel quale sono rappresentati i valori medi e la distribuzione delle misure osservate. Il confronto statistico tra i gruppi ha evidenziato una differenza tra il Gruppo 1 e il Gruppo 2 ( $p = 0,033$ ), e fra il Gruppo



**Grafico 4:** media delle misurazioni cranio caudali (all'interno del box) nei tre gruppi; i valori del p value, trovati all'interno del grafico, indicano differenze fra il gruppo 1 ed il gruppo 2 ( $P=0.033$ ) e fra il gruppo 1 ed il gruppo 3 ( $P=0.007$ ) mentre nessuna differenza è stata ritrovata fra il gruppo 2 ed il gruppo 3 ( $P=0.603$ ).

**Graph 4:** Mean crown–rump length measurements (within pen) in the three experimental groups. The P-values shown in the graph indicate significant differences between Group 1 and Group 2 ( $P = 0.033$ ) and between Group 1 and Group 3 ( $P = 0.007$ ), while no significant difference was observed between Group 2 and Group 3 ( $P = 0.603$ ).

1 ed il Gruppo 3 ( $p= 0,007$ ), mentre non si sono avute differenze nel confronto tra il Gruppo 2 ed il Gruppo 3 ( $p=0,603$ ). Sempre riguardo i feti mummificati, è stata eseguita l'analisi tra le dimensioni di questi ultimi nei tre gruppi in rapporto all'età gestazionale in cui sarebbe sopraggiunta la morte del feto, in particolare usando come cut-off 80 giorni di gestazione con una misura cranio-caudale di 190 mm, come indicato dalla bibliografia (tabella 5) (*Appendix A*, s.d.), momento in cui è stata eseguita la prima vaccinazione.



**Grafico 5:** frequenza di mummificazioni <190 mm (no) e >190 mm (si)

**Graph 5:** Frequency of mummified fetuses < 190 mm (no) and  $\geq 190$  mm (yes).

I risultati non hanno mostrato nessuna significatività statistica; tuttavia, nei gruppi 2 e 3 i feti mummificati sono numericamente più frequenti rispetto al gruppo 1 mostrando al riguardo una linea di tendenza. I dati relativi sono riportati nella tabella 4 e nel grafico 5.

Gruppo di studio \ 190 mm	no	si	Totale
1	0,370	0,154	0,337
2	0,315	0,385	0,326
3	0,315	0,462	0,337
Totale	1,000	1,000	1,000

**Tabella 4:** nessuna differenza nei tre gruppi relativamente a feti mummificati <190 mm,  $P < 0.05$   
**Table 4:** No differences were observed among the three groups regarding mummified fetuses < 190 mm ( $P > 0.05$ ).

Relativamente alle PCR per PRRSV dei 18 campioni salivari conferiti all'istituto sperimentale della Lombardia-Emilia-Romagna sezione di Parma, hanno dato esito negativo per tutti i campioni analizzati. Analogo risultato si è ottenuto dalle PCR per PRRSV dei pools degli emosieri testicolari conferiti all'istituto sperimentale della Lombardia Emilia-Romagna sezione di Reggio Emilia relativo alle tre bande oggetto dello studio.

## DISCUSSIONE

Il risultato principale emerso dal presente studio riguarda il miglioramento statisticamente significativo della portata al parto nel gruppo sottoposto al protocollo di biosicurezza più rigoroso durante le vaccinazioni in gestazione. Tale evidenza suggerisce che le modalità operative adottate nelle procedure sanitarie routinarie possano influenzare la stabilità riproduttiva aziendale anche in assenza di modifiche del piano vaccinale, coerentemente con quanto riportato in letteratura in merito alla trasmissione indiretta del PRRSV (Pileri & Mateu, 2016).

L'utilizzo di aghi monouso per ogni animale riduce il rischio teorico di trasmissione ematica di agenti patogeni tra soggetti appartenenti allo stesso box, mentre il cambio sistematico dei copri-calzari limita la diffusione meccanica tra box differenti attraverso materiale organico potenzialmente contaminato (Dee et al., 2002) mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV. È plausibile che l'effetto combinato di tali misure abbia contribuito a ridurre micro-eventi infettivi subclinici in fase gestazionale.

Le minori dimensioni medie dei feti mummificati riscontrate nel gruppo sottoposto a protocollo tradizionale supportano l'ipotesi di eventi di morte fetale avvenuti in epoca gestazionale più precoce. Nella specie suina, la morte fetale e la conseguente mummificazione rappresentano spesso l'espressione finale di eventi verificatisi settimane prima del parto, e la lunghezza cranio-caudale del feto costituisce un indicatore indiretto dell'età gestazionale al momento del decesso.

Le cause di morte fetale nella scrofa sono ampiamente riconosciute come multifattoriali e

comprendono sia fattori infettivi sia non infettivi. Tra le cause infettive rientrano numerosi agenti virali e batterici, quali Parvovirus suino, virus influenzali, PRRSV, *Leptospira spp.* e *Salmonella spp.*, in grado di determinare danno placentare, compromissione della perfusione utero-placentare o infezione diretta del feto, con esiti variabili in funzione dello stadio gestazionale al momento dell'insulto (Jeffrey J. Zimmerman et al., 2019; Maes et al., 2023). Accanto alle cause strettamente infettive, devono essere considerati anche fattori metabolici e gestionali. Stati febbrili sistemici, squilibri nutrizionali, condizioni di stress termico o sociale e alterazioni endocrine possono interferire con il mantenimento della gravidanza, influenzando la produzione di progesterone e la stabilità dell'ambiente uterino (Jeffrey J. Zimmerman et al., 2019). Inoltre, procedure ripetute di manipolazione durante la gestazione possono determinare risposte da stress mediate dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, con incremento dei glucocorticoidi circolanti e potenziale impatto sulla perfusione uterina e sulla sopravvivenza fetale in soggetti predisposti.

La variabilità individuale della risposta immunitaria materna e il diverso grado di maturazione immunologica del feto nelle varie fasi della gestazione contribuiscono ulteriormente a rendere eterogeneo il quadro clinico e produttivo osservato in caso di eventi avversi durante la gravidanza.

La negatività dei campioni di fluido orale non consente di escludere completamente una circolazione intermittente del virus della PRRS, considerando la breve durata della viremia negli adulti e le caratteristiche del monitoraggio mediante fluidi orali, metodica validata per indagini di gruppo ma dipendente dal timing del campionamento (Prickett et al., 2008).

Nel complesso, i risultati ottenuti suggeriscono che interventi gestionali relativamente semplici, quali la sostituzione sistematica dell'ago e il cambio delle calzature tra box, possano contribuire alla stabilità riproduttiva aziendale riducendo il rischio di perdite gestazionali potenzialmente correlate a trasmissione meccanica intra-allevamento.

## CONCLUSIONI

I risultati del presente studio indicano che l'adozione di misure di biosicurezza interna più rigorose durante le procedure vaccinali in gestazione è risultata associata a un miglioramento significativo della portata al parto in un allevamento suinicolo a gestione intensiva con stato sanitario convenzionale.

In particolare, la combinazione di utilizzo sistematico di aghi monouso per ogni animale e cambio dei copri-calzari tra box ha evidenziato un beneficio rispetto al protocollo tradizionale con il solo cambio di un ago per scrofa, suggerendo che le modalità operative di esecuzione delle vaccinazioni possano influenzare la stabilità riproduttiva aziendale.

L'assenza di differenze nei parametri legati al parto, indica che l'effetto osservato non ha modificato la dimensione della nidiata o la sopravvivenza neonatale, ma ha verosimilmente contribuito alla riduzione delle perdite gestazionali. Le differenze morfometriche rilevate nei feti mummificati supportano l'ipotesi di eventi di morte fetale più precoci nei gruppi sottoposti a minore rigore gestionale.

Pur in assenza di evidenza diretta di circolazione di PRRSV nel periodo di studio, i dati ottenuti evidenziano come la gestione operativa delle procedure sanitarie possa rappresentare un fattore determinante nella prevenzione della trasmissione meccanica intra-allevamento.

Considerata la semplicità applicativa e il limitato impatto economico delle misure adottate, l'integrazione di protocolli vaccinali con standard elevati di biosicurezza interna rappresenta un intervento gestionale concreto, replicabile e potenzialmente efficace nel miglioramento della performance riproduttiva in condizioni di campo.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Appendix A: Gestational Age Estimation Based on Fetal Measures and Phenotypic Characteristics*. (s.d.). Recuperato 15 febbraio 2026, da <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/chapter-epub/10.1002/9781119949053.app1>
2. Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Joo, H. S., & Pijoan, C. (2002). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through-out a coordinated sequence of events during cold weather. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(4), 232–239.
3. Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz, Gregory W. Stevenson, & Jianqiang Zhang. (2019). *Disease of Swine*. Wiley Blackwell.
4. Maes, D., Peltoniemi, O., & Malik, M. (2023). Abortion and fetal death in sows. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 58 Suppl 2, 125–136. <https://doi.org/10.1111/rda.14436>
5. Pileri, E., & Mateu, E. (2016). Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*, 47, 108. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4>
6. Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.-J., Evans, R. B., & Zimmerman, J. J. (2008). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 20(2), 156–163. <https://doi.org/10.1177/104063870802000203>

# VALUTAZIONE DELLE LESIONI DELLA CODA AL MACELLO: AFFIDABILITÀ E VALIDITÀ DI UN PROTOCOLLO DI SCORING MULTI-VIEW SU IMMAGINI DIGITALI

## SLAUGHTERHOUSE ASSESSMENT OF TAIL LESIONS: RELIABILITY AND VALIDITY OF A MULTI-VIEW IMAGE-BASED SCORING PROTOCOL

D'ALTERIO R.<sup>1,4</sup>, BAGHINI S.<sup>2</sup>, LUISE D.<sup>3</sup>, TIBURZI A.<sup>1</sup>, UGUZZONI M.<sup>3</sup>,  
GOULUNOVA E.<sup>3</sup>, ROMANO A.<sup>2</sup>, BERNABO' N.<sup>2</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>2</sup>, TREVISI P.<sup>3</sup>,  
CAPOBIANCO DONDONA A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Farm4trade s.r.l., Atessa (Chieti);

<sup>2</sup>Università degli studi di Teramo; Dipartimento di Medicina Veterinaria;

<sup>3</sup>Università di Bologna; Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari;

<sup>4</sup>Università degli studi di Milano; Dipartimento di Informatica

**Parole chiave:** lesioni della coda, affidabilità inter-osservatore, macello

**Key words:** tail lesions, inter-observer reliability, slaughterhouse

### Riassunto

Le lesioni da morsicatura della coda rappresentano un importante indicatore di benessere nella filiera suinicola (*iceberg indicator*). Tuttavia, la loro valutazione al macello soffre spesso di scarsa riproducibilità tra valutatori. Il presente studio riporta i risultati di un esercizio di concordanza inter-osservatore, condotto con valutatori esterni indipendenti, finalizzato a quantificare l'affidabilità e la validità di un protocollo di *scoring* a 3 livelli (scala ordinale 0/1/2) e della classificazione della lunghezza della coda (lunga/corta), applicato su immagini digitali acquisite automaticamente al macello. Un *panel* di 11 valutatori esterni indipendenti, provenienti da istituzioni di 6 Paesi europei, ha valutato un *dataset* di 1.600 code, ciascuna rappresentata da 3 angolazioni (sinistra, centro, destra). I risultati indicano un accordo eccellente per la classificazione della lunghezza della coda (*Intraclass Correlation Coefficient*, ICC = 0.822) e un accordo moderato per lo *score* delle lesioni (ICC = 0.491). L'analisi delle componenti della varianza ha evidenziato che la soggettività degli operatori incide minimamente sulla lunghezza, ma rappresenta una sfida nella discriminazione delle lesioni lievi (classe 1). I risultati suggeriscono che la formazione strutturata dei valutatori rappresenta il passaggio più critico per migliorare la concordanza, soprattutto quando la valutazione si basa su immagini anziché sull'ispezione diretta in campo.

### Summary

Tail lesions are a key welfare indicator in the pig sector, yet abattoir assessment often lacks inter-rater reproducibility. This study reports the results of an inter-observer agreement exercise, conducted with independent external assessors, aimed at quantifying the reliability and validity of a 3-point scoring protocol and tail length classification (long/short) based on digital images automatically acquired at slaughter. A panel of 11 independent external experts from institutions across 7 European countries assessed a dataset of 1,600 tails, each represented by 3 angles (multi-view). Results show excellent agreement for tail length classification (*Intraclass Correlation Coefficient*, ICC = 0.822) and moderate agreement for lesion scoring (ICC = 0.491). Variance component analysis revealed that operator subjectivity has minimal impact on length assessment but challenges the discrimination of mild lesions (score 1). Findings suggest that structured assessor training is the most critical step to improve agreement, particularly when assessment relies on images rather than direct on-site inspection.

## INTRODUZIONE

Il rilievo delle lesioni da morsicatura della coda (*tail-biting*) all'atto della macellazione è ritenuto un elemento chiave per il monitoraggio del benessere dei suini, in grado di offrire un *feedback* essenziale agli allevatori. Tale rilievo si basa solitamente sull'ispezione visiva diretta della coda. Tuttavia, l'elevata velocità della catena di macellazione, l'affaticamento progressivo dell'operatore e la difficoltà di osservare la coda da tutte le angolazioni inducono a sottostimare la prevalenza delle lesioni, compromettendo spesso la concordanza tra osservatori (Keeling *et al.*, 2012). La letteratura scientifica propone diversi sistemi di *scoring*, che variano da scale binarie (presenza/assenza) a sistemi piuttosto complessi fino a 6 punti (Marruchella *et al.*, 2026). Ai fini dell'addestramento di sistemi di visione artificiale (*Computer Vision*), indispensabili per l'automazione del processo, è tuttavia necessario un equilibrio tra dettaglio patologico e riproducibilità del dato. Per questo motivo, riteniamo utile condividere i risultati di un esercizio di concordanza inter-osservatore con validazione rispetto a un riferimento *Gold Standard* (GS), condotto nell'ambito del progetto TailScan con valutatori indipendenti non coinvolti nello sviluppo del protocollo. Lo scopo è quantificare l'affidabilità (accordo inter- e intra-osservatore) e la validità (rispetto al GS) di un protocollo di *scoring* applicato su immagini, sfruttando un approccio *multi-view* (tre viste per coda) per superare i limiti della singola prospettiva, valutando al contempo l'adeguatezza del manuale di *scoring* come strumento di formazione autonomo.

## MATERIALI E METODI

### Metodo di *scoring*

È stato adottato un sistema di *scoring* a 3 punti descritto nel “*Manual for tail scoring*” del progetto TailScan e derivato dal protocollo Welfare Quality®. Le definizioni operative sono di seguito riassunte:

- **Lunghezza della coda:**
  - *Long (0)*: Coda integra o di lunghezza naturale.
  - *Short (1)*: Coda di lunghezza compatibile con la pratica della caudectomia.
- **Lesioni (Scala Ordinale):**
  - **Score 0 (Nessuna/Minima)**: Coda integra, presenza di artefatti.
  - **Score 1 (Lieve/Moderata)**: Lesioni cutanee superficiali e/o di lieve entità, cicatrici che non deformano il profilo della coda, perdita di tessuto di piccole dimensioni (“indentature” della punta della coda).
  - **Score 2 (Grave)**: Ferite profonde, necrosi, amputazioni parziali/totali della coda riferibili a *tail biting*, fratture/lussazioni, cicatrici di notevoli dimensioni, marcata alterazione del profilo anatomico della coda.

### Dataset e acquisizione delle immagini

Lo studio ha utilizzato un *dataset* di 1.600 unità di valutazione (code). Ogni unità è composta dall'integrazione di 3 immagini (vista sinistra, centrale e destra) della stessa coda, acquisite in quattro macelli europei situati in Finlandia, Spagna, Italia e Paesi Bassi, dopo passaggio nel vascone di scottatura e spazzolamento della carcassa. Il *dataset* è stato costruito con una strategia di “arricchimento” (*enrichment strategy*), sovra-campionando le lesioni (*score* 1 e 2) rispetto alla loro distribuzione naturale (classe 0 ≈ 84%, classe 1 ≈ 11%, classe 2 ≈ 5%), bilanciando al contempo la rappresentanza dei macelli (360 code per stabilimento) e la lunghezza della coda (720 lunghe / 720 corte nel *core dataset* di 1.440 code uniche). La distribuzione finale nel *set* di validazione è risultata: Classe 0 ≈ 55%, Classe 1 ≈ 28%, Classe 2 ≈ 18%.

## Disegno sperimentale e Analisi Statistica

Hanno partecipato allo studio 11 osservatori indipendenti (codificati da A01 ad A11), provenienti da enti di ricerca, autorità sanitarie e operatori del settore di 6 Paesi europei (Italia, Finlandia, Norvegia, Paesi Bassi, Spagna, Svezia). I valutatori hanno ricevuto unicamente il manuale di *scoring* del progetto TailScan, senza sessioni di calibrazione o formazione aggiuntiva. Le valutazioni di riferimento sono state definite all'interno del progetto TailScan (*gold standard*, GS). Per valutare la coerenza interna (intra-osservatore), sono stati inseriti nel *dataset* 160 duplicati "nascosti" (*blind duplicates*), per un totale di 320 valutazioni di controllo. Le metriche statistiche calcolate includono:

- **Accordo inter-osservatore:** *Krippendorff's alpha* ( $\alpha$ ) e *Intraclass Correlation Coefficient* (ICC, modello 2,1).
- **Validità vs. GS:** *Quadratic Weighted Kappa* (QWK) per lo *score* ordinale e *Cohen's Kappa* per la lunghezza.
- **Decomposizione della varianza:** ANOVA a due vie per isolare la variabilità dovuta alla coda (differenze reali), al valutatore (soggettività) e al residuo (errore/rumore).

## RISULTATI

### Classificazione della lunghezza della coda

La distinzione tra coda "lunga" e "corta" ha mostrato l'affidabilità più elevata tra tutti i *task*. L'accordo tra gli 11 esperti e il GS è risultato eccellente, con valori di *Cohen's Kappa* compresi tra 0.679 e 0.907. L'analisi della varianza (Tabella 1) conferma che l'82.2% della variabilità dei dati è attribuibile alle reali differenze tra le code, mentre solo l'1.4% è imputabile all'effetto dell'operatore.

### Scoring ordinale delle lesioni

La valutazione della gravità delle lesioni ha prodotto un accordo moderato. Il QWK rispetto al GS variava tra 0.433 e 0.662 tra i diversi osservatori. La scomposizione della varianza ha rivelato che il 49.1% della variabilità riflette la reale gravità della lesione, ma una quota significativa (44.7%) è attribuita al "rumore" residuo, indicando difficoltà nella classificazione univoca di casi *borderline*. In particolare, il tasso di richiamo (*recall*) per lo *score* 1 (lesione lieve/moderata) si è attestato tra il 12% e il 49% per la maggior parte dei valutatori, evidenziando che questa categoria intermedia è la fonte primaria di disaccordo.

### Analisi dei *bias* sistematici

L'analisi ha permesso di identificare due *cluster* di valutatori: quelli tendenti a sovrastimare la gravità (es. A02, con una deviazione media di +0.451 rispetto al GS) e quelli tendenti a sottostimarla (es. A06, deviazione -0.192).

Metrica / Task	Lunghezza coda (short/long)	Scoring delle lesioni (0/1/2)
Accordo inter-osservatore ( $\alpha$ )	0.911	0.690
Affidabilità (ICC 2,1)	0.822	0.491
Varianza dovuta alla coda	82.2%	49.1%
Varianza dovuta all'operatore	1.4%	6.2%
Varianza residua (rumore)	16.4%	44.7%

**Tabella 1.** Sintesi delle metriche di affidabilità e scomposizione della varianza (Fonte: Report 19.02.2026).

**Table 1.** Summary of Reliability Metrics and Variance Decomposition (Source: Report 19.02.2026).

### **Affidabilità intra-osservatore**

La coerenza dei singoli esperti nel valutare le stesse immagini in momenti diversi è risultata alta per la lunghezza della coda (*Cohen's Kappa* 0.82–0.97) e da moderata a sostanziale per lo *scoring* delle lesioni (QWK 0.578–0.839).

### **DISCUSSIONE**

I risultati ottenuti confermano che la valutazione della lunghezza della coda tramite immagini è un processo robusto e scarsamente influenzato dalla soggettività dell'osservatore. Questo dato è coerente con quanto riportato da Romano *et al.* (2026), che hanno confrontato valutazioni visive dirette e su immagini in un protocollo analogo, suggerendo che la rilevazione automatica della caudectomia è un obiettivo immediatamente raggiungibile.

Al contrario, lo *scoring* delle lesioni rappresenta una sfida più complessa. La varianza residua elevata (44.7%) e la bassa sensibilità sulla classe 1 indicano che la “zona grigia” tra una coda sana (con piccoli graffi e/o artefatti) e una con lesioni lievi resta il nodo critico. Tuttavia, è importante contestualizzare questo risultato: i valutatori del presente studio hanno ricevuto esclusivamente il manuale di *scoring* come strumento di formazione, senza sessioni di calibrazione o *training* dedicato. In questo senso, lo studio ha testato l'adeguatezza del manuale come mezzo formativo autonomo piuttosto che la massima concordanza raggiungibile dal protocollo. Questo fenomeno è ben noto in letteratura: Keeling *et al.* (2012) hanno osservato che l'incoerenza tra osservatori riguarda principalmente le lesioni di bassa gravità, mentre Valros *et al.* (2020) hanno sottolineato come la definizione di “coda sana” sia spesso il punto più critico.

Un punto di forza fondamentale di questo studio è l'utilizzo di 3 viste per ogni coda. L'integrazione di tre angolazioni nel giudizio finale replica più fedelmente l'ispezione al macello rispetto a una singola foto 2D, riducendo il rischio di “falsi negativi” dovuti all'occultamento della lesione. Tuttavia, anche con tre viste, la distinzione tra un artefatto di macellazione (es. scottatura, abrasione meccanica) e una lesione lieve rimane difficile; il miglioramento progressivo della qualità delle immagini acquisite dai sistemi automatizzati potrà contribuire a ridurre questa ambiguità.

L'arricchimento del *dataset* con un'alta prevalenza di lesioni (*score* 2  $\approx$  17.7% vs. 5% naturale) è stata una scelta metodologica necessaria per la validazione statistica, ma implica che i valori di accordo potrebbero differire in un contesto di *routine* con prevalenze molto basse. È inoltre rilevante che il *dataset* includa casistiche provenienti da quattro macelli di Paesi diversi (Finlandia, Spagna, Italia, Paesi Bassi), con proporzioni di caudectomia eterogenee (dal  $\approx$  99% spagnolo alle code integre finlandesi), a riflettere la reale variabilità delle condizioni operative europee.

### **CONCLUSIONI E IMPLICAZIONI**

La conclusione più rilevante di questo studio è che la formazione strutturata dei valutatori costituisce il passaggio più critico per garantire una concordanza adeguata, a maggior ragione quando la valutazione si basa su immagini anziché sull'osservazione diretta in campo. In particolare, lo studio indica che:

1. La classificazione della lunghezza della coda su immagini *multi-view* è altamente affidabile e pronta per l'automazione.
2. Lo *scoring* delle lesioni presenta una variabilità concentrata nella classe intermedia (*score* 1). La scala a 3 livelli rimane tuttavia necessaria e praticabile: i dati mostrano che il disaccordo è quasi esclusivamente tra categorie adiacenti (accordo adiacente  $\geq$  93%), indicando una sfida di calibrazione piuttosto che un difetto strutturale

del protocollo. Un *training* dedicato sulle casistiche *borderline*, supportato anche dall'analisi dei *bias* individuali che questo studio ha consentito di evidenziare, e l'esposizione alla variabilità delle condizioni riscontrate nei diversi macelli europei potranno migliorare sensibilmente la concordanza.

3. L'approccio basato su immagini *multi-view* offre un dato oggettivo e tracciabile, superiore alla variabilità non documentata dell'ispezione visiva in linea. Il miglioramento progressivo della qualità delle immagini e degli algoritmi di acquisizione contribuirà a ridurre ulteriormente le ambiguità residue.

Questi risultati supportano l'uso delle immagini raccolte dai sistemi automatizzati (es. TailScan) non solo per il monitoraggio del *tail biting*, ma come base dati polivalente per la digitalizzazione del controllo qualità al macello.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringraziano tutti i macelli partner del progetto TailScan (cofinanziato dall'Unione Europea), e tutti i valutatori che hanno partecipato all'attività di valutazione del protocollo di scoring.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Keeling L.J, Wallenbeck A., Larsen A., Holmgren N. (2012). "Scoring tail damage in pigs: an evaluation based on recordings at Swedish slaughterhouses". *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54:32.
2. Manual for tail scoring. Version 06.11.2025. TailScan Project.
3. Marruchella G., Romano A., Capobianco Dondona A. (2026). "Assessing tail-biting in slaughtered pigs – a comprehensive overview". *Veterinaria Italiana*, 62(1).
4. Romano M.N. *et al.* (2026). "Development and validation of an image-based tail scoring system for pigs at slaughter". *Frontiers in Veterinary Science*, 13, 1751411.
5. TailScan External Validation – Reliability and Validity Report. Version 06 – 19.02.2026. Internal technical report.
6. Valros A., Välimäki E., Nordgren H., Vuğts J., Fàbrega E., Heinonen M. (2020). "Intact Tails as a Welfare Indicator in Finishing Pigs? Scoring of Tail Lesions and Defining Intact Tails in Undocked Pigs at the Abattoir". *Frontiers in Veterinary Science*, 7:405.

# UNA SFIDA INVISIBILE: L'IMPATTO EMOTIVO E PSICOLOGICO DELL'EMERGENZA PSA SUGLI ALLEVATORI

## *AN INVISIBLE CHALLENGE: THE EMOTIONAL AND PSYCHOLOGICAL IMPACT OF PSA EMERGENCY ON FARMERS*

PRATO PREVIDE E.<sup>1</sup>, GALIMBERTI L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Docente di Psicologia, Università di Milano*

<sup>2</sup> *ATS Milano Città Metropolitana, Presidente OMV Lodi*

**Parole chiave:** Emergenza PSA, Impatto psicologico, Impatto emotivo

**Key words:** ASF outbreak, Psychological well-being, Emotional distress

### **Riassunto**

Le epidemie degli animali da reddito, oltre ad un impatto economico, possono avere ricadute psicologiche importanti con ripercussioni a lungo termine sugli allevatori. Tuttavia, in Italia le ricerche su questo aspetto sono praticamente assenti.

Questo studio valuta l'impatto dell'epidemia di PSA sul benessere psicologico di allevatori di suini del Nord-Ovest, con allevamenti situati in diverse zone di restrizione. 74 allevatori (64 uomini e 10 donne) hanno compilato anonimamente un questionario con 32 domande basate sulla letteratura esistente. È emerso un chiaro disagio psicologico, caratterizzato da timore, ansia, forte stress ed emozioni negative legate alla PSA, soprattutto con l'esplosione dei primi focolai. L'impatto negativo riguarda sia il benessere psicofisico sia le relazioni familiari e con i dipendenti. L'emergenza della PSA, con anche perdita e abbattimento di animali, è considerata molto stressante e dolorosa, con effetti negativi sull'autostima, sentimenti di fallimento personale e un senso di perdita di controllo sul proprio futuro e quello dell'azienda.

Emerge insoddisfazione e sfiducia verso le autorità pubbliche nel loro complesso, sia in termini di prevenzione (controllo della fauna selvatica) che rispetto al contenimento dell'emergenza nei territori interessati. Un dato interessante è il riconoscimento da parte degli allevatori dell'utilità di usufruire di un appoggio psicologico per gestire meglio lo stress e fronteggiare le emergenze.

### **Abstract**

Disease outbreaks in farm animals besides their economic impact can have significant psychological effects on farmers' wellbeing both in the short and long term.

However, to our knowledge, there are no studies on this issue in Italy. This study evaluates the impact of the ASF outbreak on the psychosocial well-being of swine farmers of north-western Italy, whose farms were in different restriction zones. Seventy-four farmers (64 M and 10 F) completed an anonymous questionnaire containing 32 questions and derived from previous literature. A clear psychological distress emerges, characterized by fear, anxiety, high stress and negative emotions related to ASF, especially at the outbreak of the first cases. The negative impact concerned both psychological and physical well-being, as well as family and employee relationships.

The PSA emergency, with the loss and culling of animals, was considered highly stressful and traumatic, with negative effects on self-esteem, feelings of personal failure and a perceived loss of control over one's own future and that of the farm.

There is dissatisfaction and distrust towards public authorities in general, both in terms of

prevention (wildlife management) and containment of the emergency in the affected areas. An interesting finding is that farmers recognize the usefulness of psychological support to better manage stress and cope with emergencies.

## **INTRODUZIONE**

La diffusione della Peste Suina Africana (PSA), comparsa nel nostro Paese all'inizio del 2022 nel comune di Ovada, provincia di Alessandria, con la scoperta di una carcassa di cinghiale positiva al virus, ha rappresentato e rappresenta tuttora per la suinicoltura italiana una delle sfide più complesse degli ultimi anni sia da un punto di vista ovviamente sanitario, ma anche economico e organizzativo.

Con l'esplosione dei primi focolai negli allevamenti domestici avvenuti nell'estate 2023 in provincia di Pavia, che l'anno successivo oltre alla Lombardia hanno coinvolto anche Piemonte ed Emilia Romagna, alle conseguenze sanitarie dirette la PSA ha comportato restrizioni alla movimentazione, un incremento dei costi di produzione e di gestione aziendale, un'instabilità commerciale e un generalizzato clima di incertezza prolungato che ha inciso profondamente sulla quotidianità degli allevatori, tant'è vero che gli effetti epidemiologici e le ricadute sul mercato causate dalla malattia sono ampiamente documentati e oggetto di un costante monitoraggio tecnico-scientifico. Meno esplorata, soprattutto nel contesto nazionale, è la dimensione psicologica ed emotiva associata alla gestione delle emergenze sanitarie e in particolare della PSA sulla vita degli allevatori.

Studi internazionali (Olf, et al., 2005; Purc-Stephenson e Doctor, 2025) evidenziano che le crisi zoonositarie, indipendentemente dalla specie colpita, oltre all'onere economico, hanno un impatto emotivo e psicologico non trascurabile sugli allevatori, gli operatori e i veterinari, con notevoli livelli di distress emotivo, ansia e tutta una gamma di emozioni negative. Dalla letteratura emerge che, oltre alla riduzione dei livelli di benessere psicofisico e al disagio emotivo, gli allevatori riportano disagi familiari e sociali, confusione e difficoltà decisionali con potenziali ricadute sulla capacità gestionale e sulla sostenibilità dell'attività da svolgere. Anche scoprire di avere animali infetti e malati, insieme alla necessità di sopprimerli, provoca sentimenti di impotenza, perdita di controllo, frustrazione, senso di fallimento, preoccupazione e paura del giudizio negativo degli altri (Purc-Stephenson e Doctor, 2025). Infine, la letteratura evidenzia disagio e scontento degli allevatori per i rapporti con le autorità: i primi dichiarano spesso di sentirsi incompresi, non supportati e ingiustamente penalizzati. In sintesi, risulta chiaramente che il rischio biologico, quello economico e normativo si intrecciano in modo complesso e nel tempo causano un aumento della vulnerabilità anche psicologica degli allevatori.

In Italia l'esplosione della PSA del 2023 e del 2024, che ha causato l'abbattimento di oltre 100mila suini, ha rappresentato una minaccia sanitaria caratterizzata da elementi come l'incertezza normativa, la complessità degli adempimenti, il timore degli abbattimenti, la paura del futuro, la diffidenza verso le istituzioni, la pressione mediatica e la percezione di una stigmatizzazione territoriale che costringono l'allevatore a operare in un contesto di rischio continuo, dove la dimensione professionale e familiare risultano strettamente interconnesse: quello che però manca è la componente strettamente umana, ovvero l'impatto psicologico ed emotivo sugli allevatori.

Con un'indagine strutturata rivolta ad allevatori operanti nelle aree interessate o soggette a restrizioni per PSA, questo lavoro si propone di iniziare a valutare l'impatto psicologico ed emotivo causato dall'esplosione della PSA. Partendo dalla letteratura internazionale è stato creato un questionario online per valutare il distress psicologico dovuto alla gestione dell'emergenza, del rischio di abbattimento degli animali, degli effetti della criticità sui rapporti familiari e con i collaboratori. Anche le opinioni degli allevatori sulla propria

conoscenza e applicazione delle misure di biosicurezza sono state indagate insieme alla valutazione del ruolo delle Istituzioni e del grado di fiducia nei loro confronti. L'obiettivo del lavoro è stato quello di colmare una lacuna importante, focalizzandosi proprio sull'impatto psicologico che un'emergenza sanitaria come la PSA ha sugli allevatori.

## MATERIALI E METODI

La ricerca ha coinvolto 74 allevamenti situati nelle regioni del Nord-Ovest del Paese sede di focolai di PSA (anni 2023 o 2024) e/o situati nelle tre Zone di Restrizione. Sono state coinvolte tutte le tipologie di allevamento: riproduzione ciclo chiuso; riproduzione ciclo aperto; svezzamento; ingrasso; alta capacità; bassa capacità (300 capi); non Dpa.

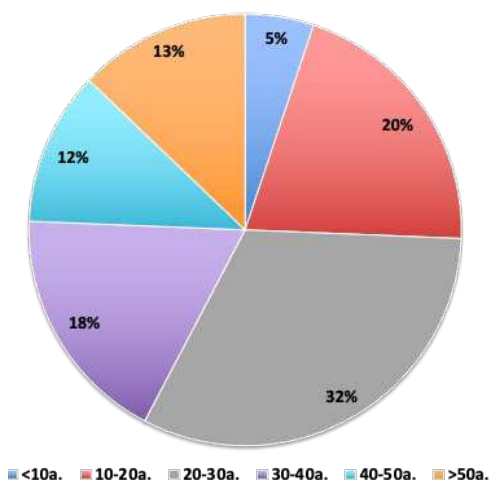
Prima dell'invio del questionario ogni allevatore è stato contattato personalmente per verificare la sua disponibilità a partecipare allo studio compilando un questionario online totalmente anonimo.

Il questionario è stato compilato dagli allevatori nel periodo compreso tra 1 aprile e 31 luglio 2025 e ha fotografato quindi la situazione esistente in quel momento. Il questionario, basato sulla letteratura esistente, includeva alcuni dati sociodemografici (età, genere) alcuni dati relativi all'attività lavorativa (anni di attività, tipo di allevamento, collaboratori, zone di restrizione) e 21 domande a risposta multipla sugli aspetti psicologici, emotivi e relazionali legati alla PSA. I dati sono stati trasferiti su un file Excel per le successive analisi.

## RISULTATI

### *Dati demografici e attività lavorativa*

Dei 74 allevatori che hanno partecipato allo studio solo 10 (14%) erano donne e i rimanenti uomini (86%). L'età dei partecipanti era compresa tra 27 anni e 74 anni. Il 13% aveva meno di 40 anni, il 62% tra 40 e 60 anni e il 25% oltre 60 anni: solo un'allevatrice aveva oltre 60 anni. La maggior parte degli allevatori svolgeva l'attività da diversi anni (Figura 1) e solo una minoranza lavorava da solo (16%).



**Figura 1.** Anni di attività degli allevatori

**Figure 1.** Number of years of farming activity

### ***Caratteristiche degli allevamenti***

Le risposte sugli allevamenti non sono sempre complete, ma risultano presenti diverse tipologie di allevamento: riproduzione a ciclo chiuso (n=13, 18%), a ciclo aperto (n=11, 15%), alta capacità (n=21, 28%); bassa capacità (<300 capi n= 2, 3%); non Dpa (n=5, 7%). Prevale l'ingrasso (n=44, 59%).

Parte degli allevamenti sono in soccida (47%) e parte non in soccida (53%).

Praticamente tutti gli allevamenti si trovavano in una delle Zone di Restrizione (ZR3=78%, ZR2 =9%, ZR1= 11%).

Al momento della compilazione del questionario il 68% degli allevamenti era attivo, il 32% non in attività e nessuno era chiuso definitivamente.

### ***Impatto psicologico ed emotivo della PSA***

Con l'esplosione dell'emergenza e dei primi focolai la maggior parte degli allevatori intervistati riporta di avere sperimentato un livello di stress estremo (40%) o forte (52%): solo una minoranza riporta uno stress moderato (8%).

Anche il timore che il virus potesse entrare nella propria azienda è stato inizialmente estremo o forte (estremo 27%; forte 51%): solo una minoranza degli allevatori riporta livelli moderati di timore (18%) o lievi (4%). Tuttavia, al momento della compilazione del questionario il timore del virus in azienda risulta minore: il 7% riferisce ancora un timore estremo, il 40% dichiara di provare un forte timore, il 36% un timore moderato e un 16% poco timore.

Una parte importante degli intervistati si è dichiarato preoccupato per il futuro della suinicoltura: l'8% si dichiara abbastanza preoccupato, il 45% molto preoccupato e il 42% estremamente preoccupato. Emerge anche che nei momenti di maggiore criticità solo il 28% degli allevatori intravedeva opportunità per far ripartire l'azienda, il 50% invece non ne vedeva e il 22% non sapeva.

Nei momenti di maggiore criticità il 35% degli allevatori riporta di avere provato contemporaneamente rabbia, paura, frustrazione e anche disperazione, gli altri di avere provato prevalentemente un tipo di emozione negativa (rabbia 26%, frustrazione 18%, paura 14%, disperazione 8%).

Alla domanda su quanto le difficoltà causate dalla PSA abbiano influito sui rapporti familiari il 26% degli intervistati afferma "moltissimo", il 34% "molto", il 25% "abbastanza" e solo il 15% dichiara che l'impatto è stato ridotto. Lo stesso emerge per i rapporti con i dipendenti: il 19% ritiene che la PSA abbia influito moltissimo, il 34% molto, il 26% abbastanza e il 21% poco.

Dover riorganizzare l'azienda per il divieto di movimentare i suini ha pesato negativamente sul morale e sui rapporti con familiari e dipendenti "moltissimo" per il 38% degli intervistati, "molto" per il 37%, e abbastanza per il 20%; solo il 5% afferma che ha avuto poco effetto.

Emerge anche che supporto e dialogo nella difficoltà sono stati forniti principalmente dai familiari (29%), seguiti dalle autorità di controllo (21%), dalla figura del veterinario libero professionista e dei collaboratori (16% e 14% rispettivamente), da altri allevatori (12%) e in ultimo dalle organizzazioni sindacali (3%). Solo una piccola parte degli allevatori (5%) non identifica una figura di supporto in particolare.

Un dato interessante è l'opinione degli allevatori su chi, tra le figure coinvolte nell'emergenza, abbia fatto "tutto il possibile" per prevenire e fronteggiare la PSA: l'83% degli intervistati ritiene di aver fatto tutto il possibile e il 16% di avere fatto almeno abbastanza. Vi è però una visione diversa nei confronti delle altre figure (veterinari liberi professionisti e tecnici): meno della metà degli allevatori (41%) ritiene che veterinari e tecnici abbiano fatto tutto il possibile, il 32% pensa che si siano impegnati solo abbastanza e il 16% che non abbiano fatto tutto il possibile.

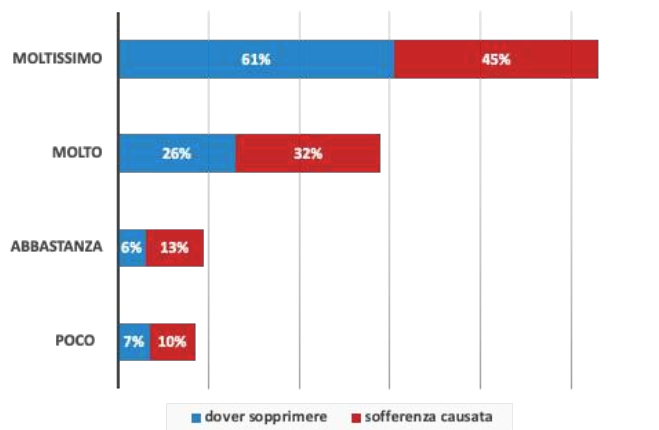
Le istituzioni sono considerate all'ultimo posto per l'impegno nel prevenire e contenere l'emergenza: il 62% degli intervistati dichiara che "non hanno fatto tutto il possibile", il 13% che lo hanno fatto solo in parte e solo il 18% afferma che hanno fatto quanto in loro potere. Alla domanda "crede di essere stato adeguatamente informato sulla patologia, la sua gravità, i rischi e i metodi di prevenzione e di intervento?" solo il 5% dice di no, mentre la maggior parte afferma di essere stato nel complesso adeguatamente informato su questi aspetti (sì: 61%; abbastanza 31%).

Rispetto alle informazioni sulle procedure di biosicurezza e l'importanza di metterle in atto nell'azienda, il 65% ritiene che gli allevatori ricevano informazioni adeguate, il 26% è parzialmente d'accordo (abbastanza) e solo l'8% dichiara che le informazioni date non siano sufficienti.

Secondo il 49% degli intervistati la PSA ha influito moltissimo sulla redditività aziendale, il 30% ritiene che ha influito molto e il 13% abbastanza: solo una minoranza dichiara che ha influito poco (8%). Allo stesso tempo il 32% afferma che la PSA ha influito moltissimo sul benessere psicofisico, il 42% molto, il 23% abbastanza e solo un 3% ritiene abbia avuto poco impatto.

Mentre il 16% crede che un supporto psicologico da parte di esperti non servirebbe per affrontare lo stress delle emergenze e il 32% risponde "Non so", il 26% degli allevatori vede favorevolmente l'aiuto psicologico (il 15% ritiene che sarebbe molto utile e l'11% utilissimo).

L'abbattimento dei suini e la loro sofferenza sono fonte di shock e distress emotivo per gli allevatori (Fig.2) e generano livelli variabili di senso di colpa o rimorso per quanto accaduto agli animali durante il focolaio di PSA poco per il 40% degli intervistati, abbastanza per il 15%, molto per il 19% e moltissimo per il 26% del campione.



**Figura 2.** Shock e stress emotivo per l'abbattimento (blu) e la sofferenza causata ai suini nell'allevamento (red)

*Figure 2. Shock and emotional distress caused by the culling of pigs (blue) and their suffering on farms (red)*

Infine, la maggior parte degli intervistati ritiene che la PSA, con anche l'abbattimento degli animali, abbia minato l'autostima generando un senso di fallimento e di perdita di controllo sul futuro dell'azienda (moltissimo 45%, molto 31%, abbastanza 19%). Solo una minoranza non lo afferma (4%).

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

La letteratura internazionale sugli effetti delle emergenze sanitarie negli allevamenti di animali da reddito sottolinea come, oltre all'impatto economico, il rischio per le aziende, il rischio biologico e l'adesione alle misure di biosicurezza, esistano anche ricadute dirette sull'allevatore di natura psicologica e sociale e più o meno intense. Questo impatto psicologico ed emotivo, oltre a minare il benessere fisico e psichico dell'allevatore, ha ricadute sulla sua capacità e lucidità nell'affrontare e gestire in modo efficace l'emergenza. Inoltre, vi sono effetti negativi sulle relazioni con i familiari, i collaboratori e i veterinari. Tuttavia in Italia non risultano ancora studi che indaghino questi aspetti.

Questo lavoro mirava ad approfondire l'impatto personale, psicologico ed emotivo, che l'emergenza sanitaria causata dalla PSA ha avuto sugli allevatori, colmando una lacuna a nostro avviso importante. I risultati del questionario diretto ad allevatori coinvolti direttamente e/o indirettamente dalle conseguenze della PSA, confermano quanto emerge dagli altri studi in letteratura: gli allevatori sperimentano stress cronico con emozioni forti e negative correlate alla gestione dell'emergenza e alla perdita degli animali, che possono interferire con la capacità decisionale, i rapporti con i famigliari e i collaboratori e la pianificazione del futuro dell'azienda. Emerge che la PSA è stata percepita non solo come una crisi produttiva, ma come un evento ad alto impatto globale sulla vita degli allevatori. La grande maggioranza degli intervistati riporta sia un impatto molto o moltissimo rilevante sulla redditività aziendale sia sul proprio benessere psicofisico. Questo suggerisce una stretta interconnessione tra dimensione economica e dimensione personale.

In ambito zootecnico identità professionale, stabilità familiare e continuità aziendale sono profondamente intrecciate e la perdita economica può assumere una valenza esistenziale, configurandosi come fattore di stress prolungato.

Il fatto che la maggior parte degli gli allevatori riporti di avere fatto tutto il possibile in prima persona, seguiti in maniera un po' minore dai loro veterinari liberi professionisti e tecnici e che le autorità di controllo ed istituzionali siano state in genere percepite come entità che non hanno fatto tutto il possibile per prevenire e contenere l'emergenza suggerisce alcune riflessioni.

È possibile, ad esempio, che in un contesto ad alto impatto economico ed emotivo, come quello determinato dalla PSA gli allevatori tendano a preservare un'immagine di sé come soggetti responsabili e diligenti per non mettere in discussione la propria identità professionale. Quindi la loro valutazione potrebbe non essere esclusivamente tecnica.

Potrebbe essere così anche per la valutazione relativamente positiva dei veterinari liberi professionisti e dei tecnici, figure con cui esiste una relazione diretta, continuativa e una corresponsabilità operativa nella gestione aziendale.

La maggiore criticità espressa dagli allevatori nei confronti delle istituzioni potrebbe invece essere connessa non solo a una reale valutazione delle azioni intraprese, ma anche alla distanza relazionale e simbolica con gli attori normativi. Inoltre, a livello più generale potrebbe aver pesato nella valutazione la limitata incidenza sui determinanti più ampi, quali la gestione territoriale, il controllo della fauna selvatica o il coordinamento interistituzionale. Va notato che l'informazione ricevuta è stata considerata adeguata: solo una piccola percentuale degli allevatori ritiene di non essere stata adeguatamente informata sulla patologia, la sua gravità, i rischi e i metodi di prevenzione e intervento. Anche sulla biosicurezza, gli operatori ritengono di essere stati adeguatamente informati sulle procedure e sulla loro importanza per l'azienda zootecnica.

Gli intervistati che hanno avuto l'abbattimento dei suini, affermano che l'emergenza accompagnata dall'abbattimento dei propri animali è un'esperienza scioccante e traumatica, che oltre ad essere dolorosa intacca l'autostima, genera un senso di fallimento individuale e

di perdita di controllo che possono avere ricadute importanti nella gestione dell'emergenza. L'obbligo di sopprimere animali allevati e accuditi può generare un conflitto tra responsabilità sanitaria e valori di cura, configurando forme di distress morale. La variabilità delle risposte suggerisce tuttavia differenti modalità di elaborazione dell'evento: un forte coinvolgimento emotivo e/o strategie di razionalizzazione o distanziamento emotivo.

Nel complesso, le ricadute psicologiche possono essere ricondotte a diversi fattori emergenziali che possono sommarsi, quali le restrizioni, l'esperienza di abbattimento degli animali, l'incertezza per il futuro proprio e della propria famiglia, la mancanza di controllo e il senso di abbandono da parte delle autorità.

Un risultato interessante, in linea con i dati in letteratura, è che gli allevatori italiani, ma non tutti, riconoscono l'esistenza di un disagio psicologico, che per alcuni è forte o molto forte, e una parte di loro riterrebbe utile il poter ricorrere a un supporto psicologico da parte di specialisti per affrontare e gestire lo stress dell'emergenza. Tale risultato non omogeneo potrebbe riflettere, da un lato, la persistenza di rappresentazioni culturali che associano la richiesta di aiuto psicologico a vulnerabilità o stigma; dall'altro, una possibile apertura ancora inespressa, legata alla scarsa familiarità con interventi di sostegno strutturati in ambito rurale. L'ampia percentuale di rispondenti incerti suggerisce pertanto uno spazio potenziale per interventi di supporto integrati, calibrati sulle specificità del contesto produttivo. Varrebbe la pena di considerare questa esigenza in futuro.

Dai commenti aperti a fine questionario fatti da una parte dei partecipanti emerge anche la forte preoccupazione per la presenza della fauna selvatica, i cinghiali, nei territori interessati, pur ritenendo che molto è stato fatto e si sta facendo per la prevenzione della PSA.

In conclusione, questo lavoro suggerisce che le diverse fasi dalla gestione di un'emergenza come la PSA (prevenzione, preparazione, risposta e ripresa) possano essere considerate sotto vari aspetti tra cui quello di tenere conto della figura dell'allevatore e della sua dimensione psicologica.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Crimes D., Enticott, G. (2019). "Assessing the social and psychological impacts of endemic animal disease amongst farmers". *Front. Vet. Sci.*, 6: 342.
2. Olf M., Koeter M. W., Van Haaften E. H., Kersten P. H., Gersons, B. P. (2005). "Impact of a foot and mouth disease crisis on post-traumatic stress symptoms in farmers". *Br J Psychiatry*. 186(2), 165-166.
3. Purc-Stephenson R. J., Doctor, J. (2025). "The hill in front of you": a qualitative study of the mental health impact of livestock diseases and depopulation on farmers". *J of Agromedicine*, 30(3), 519-528.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringraziano Anna Mossini, addetta stampa della Giornata della Suinicoltura e Debora Colatrella, Sales & Event Manager di Expo Consulting srl, società organizzatrice della Giornata della Suinicoltura che ha promosso e affidato l'indagine alla professoressa Emanuela Prato Previde e al dottor Luigi Galimberti, per avere stimolato questo lavoro, per il loro entusiasmo e per i loro preziosi suggerimenti nella sua realizzazione. Un ringraziamento ad Annalisa Scollo, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino per i suoi preziosi commenti

# DEFINIZIONE DI UNA PROCEDURA OPERATIVA PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO RESIDUO PER ALLEVAMENTI SEDE DI FOCOLAIO DI PESTE SUINA AFRICANA (PSA)

## ***OPERATIONAL PROCEDURE FOR RESIDUAL RISK ASSESSMENT IN ASF-OUTBREAKS PIG FARMS***

MONTAGNIN C.<sup>1</sup>, PALADINI C.<sup>2</sup>, LEO S.<sup>2</sup>, DI SILVERIO M.<sup>2</sup>, HATHAWAY T.<sup>2</sup>,  
CANNISTRÀ M.<sup>2</sup>, GALLETTI G.<sup>3</sup>, ISCARO C.<sup>1</sup>, PAVONE S.<sup>1</sup>, FILIPPINI G.<sup>4</sup>,  
FELIZIANI F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centro di Referenza Nazionale per le malattie da Pestivirus e Asfivirus (CEREP), Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia (Italy);*

<sup>2</sup>*Azienda Unità Sanitaria Locale di Parma, Servizio Veterinario di Sanità Animale;*

<sup>3</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia (Italy);*

<sup>4</sup>*Commissario Straordinario alla Peste Suina Africana.*

**Parole chiave:** Peste Suina Africana, biosicurezza, allevamento

**Key words:** African Swine Fever, biosecurity, farm

### **Riassunto**

La Peste Suina Africana (PSA) rappresenta una delle maggiori minacce per il comparto suinicolo mondiale. Da gennaio 2022, 71 Paesi hanno segnalato la presenza della malattia, che è in continua espansione geografica. In Italia si assiste a un andamento endemico della PSA nel cinghiale, con sporadici eventi epidemici nel comparto domestico. Tra il 2023 e l'inizio del 2025, 41 allevamenti sono stati interessati da focolai di malattia tra Lombardia, Piemonte ed Emilia-Romagna. Questi eventi hanno comportato l'applicazione di importanti misure di controllo, tra cui la cessazione dell'attività allevatoriale, e forti limitazioni alla movimentazione e alla commercializzazione di animali e prodotti di origine animale.

Per far fronte alla richiesta di ripresa delle attività da parte degli operatori di allevamenti in precedenza interessati da focolai, la struttura commissariale si è dotata di una procedura formalizzata, elaborata di concerto con il Centro di Referenza Nazionale per le malattie da Asfivirus e Pestivirus (CEREP). Tale protocollo analizza sia elementi connessi alla biosicurezza che al contesto ambientale in cui l'allevamento è inserito, identifica possibili punti critici e misure di mitigazione del rischio. L'obiettivo finale è quello di definire il livello di rischio residuo di re-introduzione della malattia e supportare quindi il processo decisionale per il rilascio del nullaosta da parte del Commissario Straordinario alla PSA.

### **Abstract**

African Swine Fever (ASF) stands as one of the major threats to the global swine industry. Since January 2022, 71 countries have reported the virus, highlighting its relentless geographical expansion. In Italy, the disease has established an endemic status within the wild boar population, punctuated by sporadic outbreaks in domestic farms. Between 2023 and early 2025, 41 farms across Lombardy, Piedmont, and Emilia-Romagna were affected. These outbreaks triggered stringent containment protocols and severe restrictions on the movement and trade of livestock and derived products.

The Extraordinary Commissioner's office, in collaboration with the National Reference Centre for Asfivirus and Pestivirus (CEREP), has drafted a standardized risk-assessment procedure to address the repopulation requests from farmers previously impacted by the virus. The

protocol has the aim to assess the residual risk of ASF reintroduction, evaluating both on-farm biosecurity and the epidemiological variables of the surrounding environment, in order to provide a decision-making basis regarding the authorization to resume farming operations.

## **INTRODUZIONE**

La peste suina africana (PSA) è una malattia infettiva di origine virale che colpisce sia i suini domestici che selvatici. Nell'Unione Europea (UE), il genotipo II è stato introdotto nel 2014 e, attualmente, è stato segnalato in diversi Stati membri, nella maggior parte dei quali la malattia è endemica nella popolazione di cinghiali con sporadici eventi epidemici nel comparto suinicolo domestico. Nonostante l'assenza di potenziale zoonosico, l'impatto socio-economico della malattia è molto elevato: le restrizioni commerciali associate all'insorgenza dell'infezione possono interrompere il commercio di animali e prodotti derivati, con conseguenze economiche devastanti per il settore suinicolo.

Nel gennaio 2022 l'Italia ha notificato la presenza del genotipo II nel territorio continentale per la prima volta, in un'area a cavallo tra Piemonte e Liguria. Attualmente, la malattia è presente come unico cluster che coinvolge 5 regioni (Piemonte, Liguria, Lombardia, Emilia-Romagna, Toscana) e 19 province (1). La PSA continua a persistere sul territorio e a diffondersi per contiguità tra le popolazioni di cinghiali, determinando una progressiva espansione del fronte epidemico verso sud-est.

La presenza della malattia nel cinghiale rappresenta una minaccia costante di introduzione del virus nel comparto suinicolo (2). Nell'ambito del cluster del nord-ovest, si sono verificati due diversi episodi epidemici di incursione del virus negli allevamenti suinicoli, in particolare durante il periodo estivo. Il primo, nel 2023, ha coinvolto 9 allevamenti della Lombardia (province di Pavia, Milano, Lodi), a cui ha fatto seguito anche un focolaio in un allevamento Sardo, in provincia di Nuoro, correlato epidemiologicamente. Nei mesi estivi del 2024, 31 focolai sono stati invece segnalati in allevamenti domestici di Piemonte (provincia di Novara ed Alessandria), Lombardia (province di Lodi, Pavia, Milano) ed Emilia-Romagna (provincia di Piacenza). L'ultimo focolaio notificato nei suini domestici risale a gennaio 2025, in provincia di Piacenza.

In caso di ingresso della malattia in allevamento, la normativa europea e nazionale prevede l'immediato abbattimento di tutti i suini dell'allevamento colpito, la disinfezione delle aree di allevamento e l'istituzione di zone in cui la movimentazione di suini e prodotti di origine suina deve essere fortemente limitata e controllata (Reg. (UE) 2016/429, Reg. (UE) 2020/687, Reg. (UE) 2023/594, Decreto Legislativo n. 136/2022, Ordinanze del Commissario Straordinario alla PSA). Queste misure impattano fortemente non solo nell'azienda colpita, ma anche nelle aziende che insistono nell'area che sarà soggetta a restrizioni e nel comparto suinicolo italiano in generale.

Da gennaio 2025, gli allevamenti sede di focolaio hanno manifestato la volontà di riprendere le attività, sospese dopo l'ingresso della malattia. Da queste richieste è nata la necessità di definire una procedura nazionale formalizzata che potesse essere impiegata per valutare l'idoneità di questi allevamenti ad essere ripopolati.

Poiché attualmente non esistono opzioni vaccinali per proteggere uno stabilimento dall'introduzione e dalla diffusione del virus della PSA, occorre dotarsi di un sistema di biosicurezza aziendale ben strutturato. Questo aspetto assume un'importanza ancora maggiore per un allevamento che ha già subito l'incursione del virus, per il quale, evidentemente, le misure di biosicurezza applicate non sono state sufficienti a scongiurare la minaccia di ingresso della malattia. L'efficacia del "sistema biosicurezza", si basa su misure strutturali e misure gestionali, che devono essere efficaci ma al contempo flessibili, calibrate e adattate ai sistemi di allevamento in cui devono essere attuate e modellate allo specifico contesto epidemiologico dell'ambiente in cui l'allevamento è inserito. Ne deriva che la valutazione del rischio rappresenta lo strumento più adeguato a individuare i pericoli che hanno permesso o potrebbero permettere l'ingresso del virus in allevamento

e per identificare soluzioni idonee a ridurre tale rischio. È pertanto indispensabile che la valutazione in merito al ripopolamento di aziende sede di focolaio sia condotta caso per caso, tenendo conto della specifica realtà aziendale, delle relative criticità e potenzialità, nonché di ulteriori elementi di contesto che potrebbero incidere in modo significativo indipendentemente dal controllo dell'operatore.

Sulla base di questi elementi, il Centro di Referenza Nazionale per le malattie da Pestivirus e Asfivirus (CEREP), d'intesa con la Struttura Commissariale ed in particolare con lo staff del subcommissario incaricato a seguire questo ambito, ha definito e formalizzato una specifica procedura per la concessione dell'autorizzazione al ripopolamento degli allevamenti colpiti da focolai di PSA (Nota CSPSA-MDS-P. 0001042-22/10/2025).

La procedura, che coinvolge diverse autorità, sia locali che centrali ognuna per la sua area di competenza, è stata elaborata per identificare eventuali punti critici in termini di biosicurezza in ogni allevamento da ripopolare, considerando anche il contesto epidemiologico in cui lo stesso è inserito, e valutare le misure di mitigazione del rischio già applicate. L'obiettivo finale è quello di identificare il rischio residuo di re-introduzione della PSA in un allevamento già stato in precedenza sede di focolaio, per decidere se questo possa riprendere l'attività produttiva. Qualora la valutazione del rischio residuo identifichi la presenza di criticità non ancora risolte, la procedura supporta l'Autorità competente e l'allevatore ad individuare ulteriori misure di mitigazione del rischio che dovranno essere implementate prima che l'allevamento possa inoltrare una nuova richiesta di ripopolamento.

## **MATERIALI E METODI**

La procedura inizia con l'invio della richiesta formale di ripopolamento all'autorità competente regionale e, per conoscenza, all'autorità competente locale.

Il percorso da seguire si articola in tre momenti e coinvolge diverse professionalità, in particolare: la struttura commissariale, attraverso il commissario designato e i suoi collaboratori (veterinari ufficiali dell'Azienda Unità Sanitaria Locale di Parma), il CEREP, l'Autorità Competente Regionale (ACR), l'Autorità Competente Locale (ACL) e gli Osservatori Epidemiologici (OE) delle Regioni in cui insiste l'allevamento che ha fatto richiesta.

### *1. Raccolta di informazioni di interesse e sopralluogo - ACL*

*In primis*, l'ACL allestisce un dossier in cui raccoglie i dati e le informazioni relativi all'allevamento che ha effettuato la richiesta e alla gestione del focolaio. Si procede con la descrizione dell'allevamento (capacità produttiva, mappe catastali e definizione dei flussi di personale, animali e mezzi) e con la raccolta degli ultimi due controlli ufficiali di biosicurezza disponibili, precedente e successivo al focolaio (completi di check-list Classyfarm, eventuali non conformità rilevate e prescrizioni). Relativamente al focolaio, vengono raccolti i documenti sulla base dei quali è stato disposto l'abbattimento (ordinanze, verbali di controllo ufficiale, non conformità rilevate e ogni altro documento ritenuto utile), i verbali con l'indicazione di tutte le operazioni di pulizia e disinfezione effettuate e l'indagine epidemiologica. Viene inoltre richiesto all'operatore il piano di biosicurezza aziendale aggiornato.

L'ACL, supportata dall'OE, fornisce anche i dati riguardanti gli altri allevamenti suini e la presenza del cinghiale all'interno di un buffer di 10 km dall'allevamento che ha effettuato la richiesta, comprensivo di mappe. In particolare, per ciascuno degli allevamenti, le informazioni devono comprendere:

- 1) orientamento produttivo (ingrasso, riproduzione, non DPA etc.), modalità di allevamento (stabulato o semibrado);
- 2) coordinate geografiche e distanza dall'allevamento sede di focolaio;

- 3) capacità massima dichiarata in BDN e numero di capi presenti alla data della preparazione dei documenti;
- 4) punteggio di conformità al DM 28/06/2022, punteggio di conformità al Regolamento (UE) 2023/594 allegato III, punteggio di sintesi dell'ultimo controllo relativo alla biosicurezza registrato su Classyfarm ed eventuali non conformità riscontrate. Per tutti gli stabilimenti il cui controllo di biosicurezza non può essere registrato in Classyfarm (es. non DPA, familiari ecc.), devono essere indicati data ed esito dell'ultimo controllo eseguito dall'ACL.

Per poter definire la presenza del cinghiale, vengono raccolti:

- 1) elementi indicativi dell'idoneità del territorio alla presenza del selvatico, quali uso del suolo, secondo il sistema del Corine Land Cover, (3) e reticolo idrografico (4);
- 2) dati numerici su cinghiali testati (segnalati, incidentati, ricerca attiva, abbattuti) (fonte: SINVSA), attività venatoria (cinghiali abbattuti in attività venatoria / controllo faunistico almeno negli ultimi 12 mesi), densità di popolazione stimata nella provincia di competenza;
- 3) battute di ricerca attiva negli ultimi 12 mesi, inteso come rapporto celle controllate / celle totali (con relativo numero di battute) o rapporto celle controllate con cani da detection / celle controllate (con relativo numero di battute).

Sulla base dei dati raccolti, l'ACL è incaricata di eseguire un sopralluogo in stabilimento, finalizzato alla verifica della presenza/il mantenimento dei requisiti di biosicurezza (DM 28/06/2022 e Reg. (UE) 2023/594, allegato III) e alla definizione delle strategie compensative e/o migliorative.

L'ACL, conclusa questa fase, se ritiene adeguato il livello di biosicurezza garantito nello stabilimento, trasmette tutta la documentazione in suo possesso al sub-commissario e al CEREP.

## 2. *Valutazione della documentazione fornita e sopralluogo – struttura commissariale (sub-commissario incaricato) e CEREP*

Il sub-commissario incaricato e il CEREP, in maniera congiunta, valutano le informazioni raccolte dall'ACL ed eseguono un sopralluogo in allevamento. L'obiettivo del sopralluogo è quello di valutare l'analisi del rischio già condotta nello stabilimento dall'ACL, suggerendo, laddove necessario, ulteriori azioni correttive o migliorative.

Sulla base delle risultanze di tali verifiche, viene redatta una relazione tecnica, comprensiva del parere del CEREP, che esprime un giudizio sul livello di rischio residuo relativo a una potenziale reintroduzione del virus per quell'allevamento.

## 3. *Eventuale rilascio del nulla osta – struttura commissariale (CSPSA)*

La relazione finale prodotta è trasmessa al Commissario straordinario alla PSA per il rilascio o meno del nulla osta al ripopolamento, che viene comunicato alla ACR e, per conoscenza, alla ACL, al sub-commissario incaricato e al CEREP.

## **RISULTATI**

Ad oggi, un totale di 10 allevamenti che sono stati sede di focolaio tra il 2023 (1/10), il 2024 (8/10) e il 2025 (1/10) ha presentato richiesta di ripopolamento. Si tratta di allevamenti tutti stabulati ad elevata capacità (>300 capi) (capacità da BDN compresa tra 2.000 e 10.860 suini), mentre la tipologia produttiva è variabile: tre sono allevamenti da riproduzione (sito 1), due sono svezzamenti (sito 2), quattro sono allevamenti da ingrasso (sito 3) e uno è un allevamento da riproduzione e svezzamento (sito 1 e 2). Di questi allevamenti, tre hanno

cambiato indirizzo produttivo al momento della richiesta di ripopolamento, passando da allevamenti da riproduzione a ciclo aperto ad allevamenti da ingrasso (2/3) o passando da svezzamento e ingrasso a solo ingrasso (1/3).

Per quanto riguarda le condizioni di biosicurezza precedenti al focolaio, solo due allevamenti presentavano una condizione di non piena conformità al DM 28/06/2022. Nella valutazione da parte della ACL successiva al focolaio, tuttavia, tre allevamenti hanno totalizzato una riduzione del punteggio di conformità, di cui due sia rispetto ai requisiti del DM 28/06/2022 che ai requisiti di biosicurezza rafforzati (Reg. (UE) 2023/594, allegato III) e uno rispetto al solo DM 28/06/2022. Solo per tre allevamenti il piano di biosicurezza aziendale è stato valutato soddisfacente.

Le indagini epidemiologiche risultano in gran parte non conclusive e solo in alcuni casi sono state avanzate delle ipotesi sulla possibile via di ingresso del virus, che comprendevano personale e tecnici (2/10), automezzi (che in un caso appartenevano a una ditta di manutenzione) (2/10) e il coinvolgimento del cinghiale (1/10).

Non esistono parametri oggettivi e universalmente riconosciuti per definire un'area ad elevata densità suinicola. Tuttavia, la metà degli allevamenti (5/10) si trova in zone dove la densità di suini supera i 34 animali/km<sup>2</sup> e per due allevamenti su dieci la densità suinicola arriva ad essere anche superiore a 266 animali/km<sup>2</sup>. Per quasi tutti gli allevamenti coinvolti (8/10), è presente, nel buffer di 10 km, almeno uno stabilimento di animali non DPA (non destinato alla produzione di alimenti) (range da 1 a 6), e, per due allevamenti, è anche presente un rifugio di animali. Per quanto riguarda le condizioni di biosicurezza degli allevamenti nel raggio dei 10 km, per i due allevamenti che sorgono nelle aree a più elevata densità di suini (*a* e *b*), è stata riscontrata la presenza di non conformità negli allevamenti limitrofi (non conformità al DM 28/06/2022,  $n_a=1$ ,  $n_b=25$ ; non conformità al Reg. (UE) 2023/594 allegato III,  $n_a=1$  e  $n_b=8$ ).

Il confronto dei dati relativi alla presenza del cinghiale è risultato molto complesso. I dati disponibili non sono sempre esaustivi e/o completi. La stima della densità di popolazione talvolta è mancante e, ad ogni modo, il suo calcolo non è standardizzato nei diversi territori coinvolti. Nei casi considerati, nel buffer erano comprese zone più o meno estese ad elevata idoneità alla presenza del cinghiale. Tuttavia, anche in questo caso, il giudizio sull'idoneità di un territorio alla presenza del cinghiale non è sempre univoco, a causa di situazioni intermedie difficili da definire con certezza. Ne consegue che non sia sempre possibile stabilire il livello di sensibilità della sorveglianza passiva e passiva rinforzata attuata. Per quattro allevamenti su dieci si è comunque esclusa la circolazione virale nei 10 km, considerando che ricadevano in Zona Libera o Zona Soggetta a Restrizioni di tipo 1 (Reg. (UE) 2023/594), il numero assoluto battute, il numero di celle battute e l'utilizzo di cani da detection.

Nel corso dei sopralluoghi congiunti effettuati dal sub-commissario alla PSA incaricato e dal CEREP è stata riscontrata una grande eterogeneità nelle realtà allevatoriali. Le criticità per le quali sono state richieste misure di mitigazione del rischio riguardavano sia elementi strutturali che gestionali per tutti gli allevamenti. Nonostante la grande differenza tra i punti critici osservati, in generale questi possono essere categorizzati in tre macroaree:

- 1) commistione strutturale e/o gestionale di zone a diverso livello di rischio (zona a stato sanitario sconosciuto – zona sporca – zona pulita);
- 2) sovrapposizione dei flussi di mezzi/persone/animali;
- 3) operazioni di pulizia e disinfezione insufficienti.

Nello specifico, per quanto riguarda la commistione strutturale e/o gestionale di zone a diverso livello di rischio, i principali elementi critici riscontrati sono stati:

- costante passaggio degli operatori da ZP e ZS e viceversa per lo svolgimento di attività aziendali di routine;

- mantenimento di strumenti impiegati in ZP (esempio rampa per il carico/scarico degli animali) in ZS o ZSSS;
- entrata di automezzi in ZP;
- entrata di mezzi agricoli o mantenimento degli stessi in ZS;
- porte dei capannoni dove sono detenuti gli animali apribili in ZS o ZSS;
- cancelli di passaggio ZP-ZS/ZSSS non chiusi ermeticamente e/o non dotati di piazzola e punto di disinfezione;
- abitazione dell'operatore/dipendente in ZS;
- rete antibestiami non sufficiente o non mantenuta in condizioni ottimali.

Degli allevamenti che hanno fatto richiesta di ripopolamento, nove hanno ottenuto il nullaosta al ripopolamento, di cui tre con richiesta di interventi minimi, mentre per sei il nullaosta è stato condizionato all'applicazione di miglioramenti consistenti delle condizioni di biosicurezza.

## **DISCUSSIONE**

L'espressione di un giudizio tecnico sul rischio residuo connesso al ripopolamento di un allevamento colpito dalla PSA è un processo complesso e multifattoriale. Devono essere considerati e ponderati sia aspetti propriamente legati allo stabilimento (conformità alla normativa, pratiche gestionali, attitudine proattiva in materia di biosicurezza) sia parametri epidemiologici del contesto ambientale (presenza della malattia nel cinghiale, densità del cinghiale e densità suinicola).

L'incurSIONE della PSA in allevamento genera misure di contenimento dall'enorme impatto sull'intero comparto suinicolo. Il danno (economico, sociale e di affidabilità del sistema di controllo) aumenta in maniera esponenziale in caso reintroduzione della malattia nello stesso allevamento. Posto che, per definizione, il rischio non è mai nullo, la necessità non è solo quella di definire il rischio residuo specifico per l'allevamento in esame, ma anche e soprattutto quella di ridurlo al minimo. Questo impone che la biosicurezza di un allevamento precedentemente infetto non possa limitarsi al mero soddisfacimento dei requisiti cogenti previsti dalla normativa nazionale ed europea (DM 28/06/2022, Reg. (UE) 2023/594, allegato III), ma debba concretizzarsi in uno standard di protezione più elevato, soprattutto quando il livello di rischio è aggravato da ulteriori fattori esterni (presenza della malattia nella popolazione di cinghiali (2), alta densità di allevamenti (5)).

Spesso però, l'eterogeneità delle situazioni allevatoriali richiede un ulteriore sforzo analitico volto a individuare misure di mitigazione del rischio che compensino eventuali lacune strutturali con elementi gestionali o, viceversa, con l'integrazione di elementi strutturali per minimizzare la possibilità di errori procedurali. Le misure di biosicurezza devono, pertanto, essere commisurate al livello di rischio, ma anche dotate di sufficiente flessibilità operativa. Per questo motivo, la procedura di valutazione consta di diversi momenti di confronto tra operatore e ACL, tra operatore e sub-commissario/CEREP e tra sub-commissario/CEREP e ACL. Tale impostazione ha consentito di individuare diversi elementi di criticità e di definire congiuntamente le possibili strategie di mitigazione del rischio.

L'applicazione della procedura ha purtroppo anche messo in luce una diffusa carenza nella consapevolezza del rischio e una insufficiente comprensione del concetto di biosicurezza da parte degli operatori, i quali, in alcuni casi, applicano le prescrizioni dell'AC, senza comprenderle a pieno. Questo rende le pratiche gestionali, già di per sé complesse da valutare, i veri fattori discriminanti di un sistema di biosicurezza funzionale ed efficace. Il corretto utilizzo della zona filtro, la rigorosa pulizia e disinfezione degli automezzi, la corretta gestione delle carcasse e l'interdizione dei mezzi agricoli all'area di allevamento e degli automezzi alla zona pulita rappresentano gli elementi cardine della gestione del rischio. In questo scenario,

le indagini epidemiologiche, spesso non conclusive e la mancanza di certezze sull'ingresso della malattia in allevamento, complicano ulteriormente l'identificazione dei punti critici e il dialogo con l'operatore.

Nonostante le difficoltà, la procedura ha definito un percorso teso a condividere un approccio per la gestione delle problematiche e raggiungere un sensibile miglioramento delle condizioni di biosicurezza per gli allevamenti coinvolti. Da sottolineare che l'autorizzazione al ripopolamento è stata concessa per nove allevamenti su dieci. L'unico allevamento che non ha ricevuto l'autorizzazione si sta comunque adoperando per un potenziamento strutturale e gestionale del suo sistema biosicurezza e non è escluso che una seconda valutazione possa concludersi favorevolmente.

## **CONCLUSIONI**

Le misure di biosicurezza si confermano lo strumento fondamentale in mano agli operatori degli stabilimenti suinicoli per ridurre il rischio di ingresso in allevamento e diffusione tra diversi allevamenti della PSA. La biosicurezza non deve essere però intesa come un protocollo statico di solo adeguamento ai dettami normativi, ma come un sistema dinamico, che deve essere ragionato e "cucito" sulla singola realtà aziendale e costantemente aggiornato. In tale contesto, l'approccio basato sulla valutazione del rischio finalizzato all'identificazione dei pericoli presenti (in termini di possibili vie di introduzione accidentale del virus nelle aziende) e alla conseguente definizione e applicazione delle idonee misure di mitigazione del rischio, di natura sia strutturale che gestionale, costituisce un elemento indispensabile per una valutazione appropriata da effettuarsi caso per caso.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Peste Suina Africana: bollettino epidemiologico nazionale: <https://storymaps.arcgis.com/stories/7f16f51731654a4ea7ec54d6bc1f90d4>
2. European Food Safety Authority (EFSA); Boklund AE, Ståhl K, Miranda Chueca MÁ, Podgórski T, Vergne T, Cortiñas Abrahantes J, Cattaneo E, Dhollander S, Papanikolaou A, Tampach S, Mur L. Risk and protective factors for ASF in domestic pigs and wild boar in the EU, and mitigation measures for managing the disease in wild boar. *EFSA J.* 2024 Dec 4;22(12):e9095. doi: 10.2903/j.efsa.2024.9095. PMID: 39633872; PMCID: PMC11615515.
3. <https://groupware.sinanet.isprambiente.it/uso-copertura-e-consumo-di-suolo/library/copertura-del-suolo/corine-land-cover>
4. [http://wms.pcn.minambiente.it/ogc?map=/ms\\_ogc/wfs/Aste\\_fluviali.map](http://wms.pcn.minambiente.it/ogc?map=/ms_ogc/wfs/Aste_fluviali.map)
5. Bellini S, Salvato S, Bernardis M, Chiari M, Martinello F, Galimberti L, Maggiano V, Feliziani F, Farioli M, Alborali GL. Epidemiological Characteristics of the African Swine Fever Genotype II Epidemic in Domestic Pigs in Lombardy (Northern Italy) in 2023 and 2024. *Viruses.* 2025 Feb 26;17(3):327. doi: 10.3390/v17030327. PMID: 40143255; PMCID: PMC11946006.

# PESTE SUINA AFRICANA: LA SORVEGLIANZA MOLECOLARE COME STRUMENTO DI STUDIO DELLA DIFFUSIONE DELLA MALATTIA E DELLA EVOLUZIONE DEL VIRUS

## *AFRICAN SWINE FEVER: MOLECULAR SURVEILLANCE AS A TOOL FOR INVESTIGATING DISEASE SPREAD AND VIRAL EVOLUTION*

BEATO M.S.<sup>1</sup>, ISCARO C.<sup>1</sup>, CAMMA' C.<sup>2</sup>, ROSSI G.<sup>3</sup>, TORRESI C.<sup>1</sup>, BICCHERI R.<sup>1</sup>,  
PIRANI S.<sup>1</sup>, GIAMMARIOLI M.<sup>1</sup>, FELIZIANI F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Centro di Referenza Nazionale per le Pesti Suine (CEREP),  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche Togo Rosati, Via G. Salvemini 1, 06132,  
Perugia, Italy;*

<sup>2</sup> *Centro di Referenza Nazionale per le Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni  
(GENPAT),*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise, Campo Boario, 64100, Teramo, Italy;*

<sup>3</sup> *EPIC & School of Biodiversity, One Health and Veterinary Medicine, University of Glasgow,  
G12 8QQ Glasgow, Scotland.*

**Parole chiave:** Peste suina africana, sequenziamento, sorveglianza molecolare.

**Keywords:** African Swine Fever, sequencing, molecular surveillance.

### **Riassunto**

La Peste Suina Africana (PSA) pone sfide complesse relativamente alle attività di caratterizzazione molecolare mediante sequenziamento. La sorveglianza molecolare rappresenta un ottimo strumento per studiare l'evoluzione genetica del virus, verificare il corretto approccio diagnostico, tracciare le possibili vie di introduzione dell'infezione, la diffusione spazio-temporale e le relazioni tra i cluster di infezione nei territori infetti; inoltre può fornire un supporto alle misure di controllo ed eradicazione della malattia. Tuttavia, gli studi filogenetici hanno confermato la bassa variabilità genomica del virus, compreso il genotipo II e di conseguenza una limitata risoluzione filogenetica. Inoltre, i costi e le conoscenze richieste per le tecniche più avanzate limitano ancora l'applicazione del sequenziamento completo su larga scala e in maniera omogenea nei paesi coinvolti; ne consegue una carenza di informazioni genomiche fruibili dalla comunità scientifica internazionale. Ciononostante, la sorveglianza molecolare rimane uno strumento fondamentale per valutare nuove introduzioni e distinguerle dalla circolazione endemica, identificare cluster geografici, verificare le misure di contenimento.

### **Abstract**

African swine fever (ASF) poses complex challenges for molecular characterisation through sequencing. Molecular surveillance is an excellent tool for studying the genetic evolution of the virus, verifying the correct diagnostic approach, tracing possible routes of infection, spatial temporal spread and relationships between infection clusters in the affected territories; it can also support disease control and eradication measures. However, phylogenetic studies have confirmed the low genomic variability of the virus, including genotype II, and consequently limited phylogenetic resolution. Furthermore, the costs and knowledge required for the most advanced techniques still limit the application of complete sequencing on a large scale and in a homogeneous manner in the countries involved; this results in a lack of genomic information for the international scientific community. Nevertheless, molecular surveillance

remains a pivotal tool for assessing new introductions and distinguishing them from endemic circulation, identifying geographical clusters and verifying containment measures.

## **INTRODUZIONE**

La Peste Suina Africana (PSA) rappresenta una delle più gravi minacce globali per il comparto suinicolo. In Europa la sua avanzata sembra inarrestabile, con nuovi paesi coinvolti nell'attuale ondata epidemica come la Spagna (2025) e altri paesi che hanno affrontato diversi cluster successivi (Germania). In Italia dal 2022 al 2025 sono stati identificati 4 cluster di infezione (il cluster del nord-ovest, il cluster Lazio, il cluster Campania/Basilicata e il cluster Calabria). Ad oggi il cluster nord-ovest, che coinvolge 5 regioni e 20 province in Piemonte, Liguria, Lombardia, Emilia-Romagna, Toscana, è l'unico attivo, in seguito al ripristino della indennità per cluster Lazio (Gennaio 2025) e Campania/Basilicata e Calabria (Novembre 2025). Sin dalla prima notifica di PSA in Italia continentale nel 2022, è stata prodotta un'analisi filogenetica e l'annotazione genomica degli stipiti virali attraverso la selezione di casi e focolai notificati, con l'obiettivo di ottenere una sorveglianza molecolare rappresentativa dei territori infetti, individuare eventuali varianti virali e comprendere caratteristiche e relazioni genetiche tra stipiti virali circolanti nei diversi cluster di infezione. L'attività di sorveglianza molecolare prevede un'analisi comparativa delle sequenze virali complete e/o parziali ottenute dai casi/focolai nazionali con quelle disponibili nei database pubblici europei e internazionali, con la finalità di individuare il grado di omologia tra gli stipiti circolanti; identificare polimorfismi puntiformi/inserzioni/delezioni, variazioni nelle regioni inter-geniche; ricostruire le relazioni filogenetiche e le catene di contagio; identificare nuove introduzioni ed eventuali ricombinazioni virali; identificare nuovi cluster epidemiologici. L'approccio integrato basato su sequenziamento parziale e completo del genoma virale e l'analisi bioinformatica ha permesso di studiare gli stipiti italiani nel contesto evolutivo globale, fornendo informazioni molecolari a supporto delle indagini epidemiologiche tradizionali. Il virus della PSA è classificato in 24 genotipi (I-XXIV) sulla base delle sequenze parziali della regione C-terminale del gene B646L/p72, che codifica la proteina del capsido p72 (1). Tra i 24 genotipi, il genotipo II è il più comune e presenta un elevato grado di identità di sequenza nei marcatori genetici solitamente utilizzati per l'assegnazione al genotipo e per la risoluzione intra-genotipica (2). Recentemente è stata proposta una classificazione del genotipo II in gruppi genetici identificati in base al sequenziamento Sanger di diverse porzioni geniche (3). In base a tale recente classificazione, ad oggi sono stati identificati 29 gruppi genetici diversi, alcuni dei quali caratterizzati da una distinta diffusione geografica (4).

## **MATERIALI E METODI**

La sorveglianza molecolare è stata condotta con continuità su una selezione di stipiti notificati nel territorio nazionale tra il 2022 e il 2025, mediante approcci integrati di caratterizzazione molecolare, in collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale per le Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni dell'IZS Abruzzo e Molise (GENPAT). Il sequenziamento parziale Sanger ("approccio multigenico") si è basato sulla tipizzazione molecolare di regioni geniche che includono geni strutturali, regioni inter-geniche altamente informative per la classificazione genetica del virus (3) e diversi marcatori molecolari addizionali, selezionati per la loro variabilità intra-genotipica nei diversi territori infetti in relazione al genotipo circolante (5). Il secondo approccio rappresenta il "*gold standard*" e prevede l'applicazione di protocolli di whole genome sequencing (WGS) ("approccio WGS") basati sull'arricchimento delle librerie genomiche mediante sonde di ibridazione (6), specificatamente disegnate sulle sequenze di riferimento del virus della PSA (Georgia 2007, acc.n. FR682468.2), con l'obiettivo di aumentare la quantità di DNA virale estratto.

In entrambi i casi, i dati ottenuti sono analizzati con approcci bioinformatici “*step-by-step*” (DNASTAR; Clustal X, Bioedit, MEGA10, BEAST, RDP3, SIMPLOT, GENIOUS) o mediante pipeline bioinformatiche (GenPat., GALAXY). Infine, è stata eseguita l’annotazione genomica (GATU, GENIOUS) e le sequenze parziali e/o complete sono state sottomesse in database pubblici (GenBank, GenPat.), per la condivisione dei dati e l’integrazione della sorveglianza molecolare a livello globale. Infine, allo scopo di comprendere quali fattori ambientali, antropici ed ecologici siano associati alla diffusione della PSA e al suo mantenimento nelle popolazioni selvatiche e domestiche, è stata anche eseguita una analisi filogeografica e filodinamica combinando i dati relativi ai genomi virali completi disponibili su archivi internazionali online e i dati spaziali, ambientali e antropici predittivi (uso del territorio, densità di popolazione umana, clima, altitudine, ecc).

## RISULTATI

Sono stati sequenziati 111 stipiti virali sia con approccio multigenico sia con WGS. Tutti gli stipiti italiani ad oggi sequenziati mostrano una elevata omologia di sequenza con le sequenze del genotipo II precedentemente descritte in altri paesi europei e nell’area del Caucaso nel 2007 (7), avvalorando la correlazione allo stesso scenario epidemiologico e confermando che solo il genotipo II sta circolando in Italia dal 2022. Gli studi relativi alla caratterizzazione molecolare mediante approccio multigenico hanno rivelato la presenza di quattro gruppi genetici in Italia precedentemente classificati da 1 a 24 ovvero i gruppi 3, 19, 25 e 26 (7). La maggior parte dei campioni risalenti all’ondata epidemica 2022-2024 appartiene al gruppo genetico 3, il più diffuso in Europa, ma si rileva anche una certa prevalenza del gruppo genetico 19 descritto anche in Europa; infine, sono stati identificati due nuovi gruppi genetici sporadici, 25 e 26, mai descritti in precedenza. Il gruppo genetico 25 è stato identificato in 10 dei 22 campioni caratterizzati nel cluster Lazio ed è abbastanza stabile nella popolazione, mentre il gruppo genetico 26 è stato segnalato solo in 4 campioni dei 57 analizzati nel cluster del nord ovest (7). L’analisi mediante WGS ha evidenziato la presenza di varianti virali caratterizzate da delezioni e/o troncamenti genomici tra gli stipiti identificati in Italia nel periodo 2022–2024, in particolare nel cluster del nord-ovest (Alessandria, 2022) e nel cluster della Calabria (2023) (4). Nel cluster del nord-ovest sei campioni riportano delezioni mai descritte in precedenza in altri Paesi. Tuttavia, l’elevata omologia di sequenza all’interno del gruppo genetico 3, maggiormente rappresentato nel cluster, rende difficile distinguere tra diffusione interna e nuove introduzioni. Nel cluster Calabria, tutti i 24 stipiti analizzati hanno mostrato ampie delezioni/traslocazioni naturali nelle regioni genomiche 5’ e 3’. In questo cluster non è stato rilevato lo stipite *wild-type* “*Italian-like*”, mentre gli stipiti deleti sono risultati stabili sia nella popolazione domestica sia in quella selvatica. Queste modifiche strutturali non sono state osservate in altri cluster italiani o transfrontalieri. I dati suggeriscono una possibile introduzione indipendente e/o dinamiche evolutive autonome. I risultati elaborati su un dataset di 228 sequenze disponibili in banca dati mostrano che presumibilmente nell’Italia continentale sono avvenute introduzioni multiple. La prima nel nord-ovest stimata a maggio 2021, dai Balcani o dall’Est-Europa (entrambi non sostenuti in modo definitivo). La seconda introduzione sarebbe avvenuta a Roma a settembre 2021, probabilmente dall’area dei Balcani, come è anche accaduto per la Calabria nel gennaio 2023. La terza introduzione sarebbe avvenuta dall’Asia sudorientale in Campania, nel febbraio 2023. Questo risultato è stato confermato dall’analisi del gene MGF 360-10L, che mostra una differenziazione tra la linea afro-europea e le linee asiatiche, che includono sequenze dalla Campania (Italia, 4) e dall’Ungheria (1). La correlazione con linee evolutive dell’Asia orientale mette in luce gaps importanti relativi alla disponibilità di dati in alcuni paesi interessati dall’infezione (8).

## DISCUSSIONE

La sorveglianza molecolare del virus della PSA attraverso attività di sequenziamento, analisi filogenetica e annotazione genomica degli stipiti virali circolanti sul territorio nazionale, avviata in seguito ai primi index cases in Italia continentale, è stata standardizzata nel tempo, al fine di ottenere una attenta sorveglianza sui territori infetti, individuare eventuali varianti virali e conoscere ciò che ha circolato nei diversi territori. Questa attività ha permesso di avere informazioni sulla tracciabilità delle introduzioni virali in Italia, sulla identificazione di cluster epidemiologici, sulla evoluzione virale, allo scopo di indirizzare le strategie di contenimento dell'infezione. L'adozione di un duplice approccio risulta utile soprattutto per gli stipiti per i quali non è possibile ottenere un sequenziamento completo. La bassa variabilità genetica del virus della PSA in generale e del genotipo II in particolare, oltre alle dinamiche di diffusione transfrontaliere della malattia, rendono difficile l'individuazione delle catene di contagio. L'impossibilità di utilizzo di un modello evolutivo continuo, a causa dell'assenza di dati genomici, metadati e informazioni ambientali nei database pubblici, rende il dato ottenuto affidabile ma non conclusivo.

Un esempio di esito non conclusivo ha riguardato l'Italia direttamente. Nel giugno 2025, nuovi casi di PSA sono stati notificati in Germania, nel Nord Reno-Westfalia. Un confronto diretto con gli stipiti virali precedentemente sequenziati in Germania ha mostrato che quel virus differisce in modo significativo dagli stipiti precedentemente identificati nello stesso paese, ma che possiede un inatteso grado di similarità con i virus identificati in Calabria (9). Tuttavia, tale dato non è sufficiente a identificare con certezza l'origine dell'infezione in Germania e/o a collegare i due cluster di infezione tra i due Paesi. Sulla base delle conoscenze derivanti dalle analisi genetiche e considerando la positiva evoluzione che nel tempo è stata registrata in Calabria, si può presumere che i due ceppi abbiano un antenato comune e che siano frutto di due introduzioni successive (prima in Italia, poi in Germania). Queste informazioni non solo suggeriscono ancora una volta l'importanza del fattore umano nella diffusione del virus PSA, ma dimostrano anche la necessità di avere a disposizione quante più sequenze genetiche possibili dei ceppi circolanti, per avere una base dati più ampia e un confronto più affidabile tra i diversi stipiti.

D'altra parte, la sorveglianza molecolare può contribuire anche a dirimere questioni fortemente mediatiche, oltre che tecniche. A novembre 2025 è stata segnalata per la prima volta la presenza del virus nella popolazione di cinghiali di un'area sub-urbana di Barcellona, Spagna. La vicinanza della zona infetta a un laboratorio statale che manipola virus della PSA ha immediatamente fatto generare l'ipotesi che l'origine dell'infezione potesse essere imputata ad una fuga dal laboratorio. Tale ipotesi ha provocato una notevole risonanza mediatica a livello nazionale ed europeo. Una commissione di esperti indipendenti, ufficialmente incaricata di verificare tale ipotesi, a febbraio 2026 ha concluso che, sebbene non vi sia ancora una risposta definitiva circa l'origine dell'infezione, la teoria della "fuga dal laboratorio" può essere accantonata. Di fatto, l'analisi degli stipiti virali ha dimostrato che il ceppo virale identificato nei cinghiali non corrisponde a nessuno dei ceppi utilizzati nelle attività sperimentali del laboratorio limitrofo, né a livello di marcatori parziali né a livello dell'intero genoma (10). Questa esperienza dimostra come talvolta, davanti a un evento grave e complesso come l'ingresso del virus della PSA in un nuovo territorio, si possa perdere di vista la causa ritenuta più probabile dalla intera comunità scientifica, cioè il fattore umano. In questo caso, gli studi filogenetici hanno permesso di giungere alla conclusione più ragionevole possibile.

## CONCLUSIONI

Gli studi filogenetici hanno l'obiettivo di identificare l'origine dell'introduzione e di dare una immagine dell'evoluzione molecolare del virus e della sua circolazione. L'Italia è un paese leader in questo ambito perché la rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali coordinata dal CEREP sta applicando un lavoro senza pari in termini di sorveglianza molecolare degli stiptipi nazionali, rendendo disponibili tramite deposito in database pubblici numerose sequenze parziali e complete, derivanti da campioni positivi alla PSA raccolti nei diversi cluster di infezione. Questa attività sta garantendo trasparenza e condivisione dei dati italiani, a supporto della comunità scientifica internazionale e di tutti i laboratori di riferimento. Attualmente, il gap di informazioni nelle banche dati internazionali riguardanti le sequenze dei campioni positivi dalla maggior parte dei paesi colpiti, rappresenta un limite importante per la tracciabilità dei focolai e riduce la possibilità di ottenere risultati precisi e completi dal confronto genetico. Le cause di questo gap, probabilmente, sono da ricercare nella complessità della sorveglianza molecolare della PSA, che richiede sforzi e risorse notevoli sia per superare oggettive criticità, sia per dotarsi di strumentazioni e know how adeguati. Le esperienze finora maturate dimostrano come sia necessario integrare le informazioni derivanti dalle attività di sorveglianza molecolare con quelle che derivano dalla conoscenza dei meccanismi patogenetici della malattia e dalla analisi della situazione epidemiologica della PSA. La creazione di network di collaborazione, la condivisione dei dati molecolari disponibili e la loro integrazione con i dati epidemiologici permettono di avere una visione del contesto quanto più completa possibile e di trovare spiegazioni attendibili a questioni complesse.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bastos A.D.S., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., Couacy-Hymann E., Thomson G.R. (2003) Genotyping Field Strains of African Swine Fever Virus by Partial P72 Gene Characterisation. *Arch. Virol.*, 148, 693–706.
2. Bastos A.D.S., Penrith M.-L., Macome F., Pinto F., Thomson G.R. (2004) Co-Circulation of Two Genetically Distinct Viruses in an Outbreak of African Swine Fever in Mozambique: No Evidence for Individual Co-Infection. *Vet. Microbiol.*, 103, 169–182.
3. Gallardo C., Casado N., Soler A., Djadjovski I., Krivko L., Madueño E., Nieto R., Perez C., Simon A., Ivanova E., et al. (2023) A Multi Gene-Approach Genotyping Method Identifies 24 Genetic Clusters within the Genotype II-European African Swine Fever Viruses Circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* 25:10:1112850
4. Torresi C., Biccheri R., Cammà C., Gallardo C., Marcacci M., Zoppi S., Secondini B., Rivero C., Soler A., Casciari C., Pela M., Rossi E., Pellegrini C., Iscaro C., Feliziani F., Giammarioli M. (2025) Genome-Wide Approach Identifies Natural Large-Fragment Deletion in ASFV Strains Circulating in Italy During 2023. *Pathogens*, 14, 51.
5. Mazloum A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. (2023) A Guide to Molecular Characterization of Genotype II African Swine Fever Virus: Essential and Alternative Genome Markers. *Microorganisms*, 11, 642.
6. Forth J.H., Forth L.F., King J., Groza O., Hübner A., Olesen A.S., Höper D., Dixon L.K., Netherton C.L., Rasmussen T.B., Blome S., Pohlmann A., Beer M. (2019) A Deep-Sequencing Workflow for the Fast and Efficient Generation of High-Quality African Swine Fever Virus Whole-Genome Sequences. *Viruses* 11, 846.
7. Giammarioli M., Torresi C., Biccheri R., Cammà C., Marcacci M., Dondo A., Razuoli E., Fusco G., Casalnuovo F., Scicluna M.T., Dei Giudici S., Martin A.M., Rossi E., Casciari C., Pela M., Iscaro C., Gallardo C., Marocco G., Orrico M., Feliziani F. Genetic Characterization of African Swine Fever Italian Clusters in the 2022–2023 Epidemic

- Wave by a Multi-Gene Approach. (2024) *Viruses*, 16, 1185.
8. Gianluigi R., Leitch E.C.M.W., Graham J., Biccheri R., Iscaro C., Torresi C., Lycett S.J., Feliziani F., Giammarioli M. A phylogenetic contribution to understanding the panzootic spread of African Swine Fever: from the global to the local scale. *Virus Evol.* 12:veaf103.
  9. [https://www.fli.de/en/press/press-releases/press-singleview-1/?tx\\_news\\_pi1%5Baction%5D=detail&tx\\_news\\_pi1%5Bcontroller%5D=News&tx\\_news\\_pi1%5Bnews%5D=2920&cHash=61c2674d6d2d358ac9cce77e2c4aa25a](https://www.fli.de/en/press/press-releases/press-singleview-1/?tx_news_pi1%5Baction%5D=detail&tx_news_pi1%5Bcontroller%5D=News&tx_news_pi1%5Bnews%5D=2920&cHash=61c2674d6d2d358ac9cce77e2c4aa25a)
  10. [https://www.mapa.gob.es/dam/mapa/contenido/ganaderia/temas/sanidad-animal-e-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/porcino/ppa/informe\\_inicial\\_ccppa.pdf](https://www.mapa.gob.es/dam/mapa/contenido/ganaderia/temas/sanidad-animal-e-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/porcino/ppa/informe_inicial_ccppa.pdf)

# ERADICAZIONE DELLA PRRS IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE MEDIANTE L'UTILIZZO DELLA TECNICA "WEAN & REMOVAL"

## PRRS ERADICATION IN A SOW HERD USING "WEAN & REMOVAL"

SANDRI G.<sup>1</sup>, BRESAOLA M.<sup>2</sup>, TECLI M.E.<sup>4</sup>, CIUCCI L.<sup>2</sup>, PESENTE P.<sup>3</sup>, PERINI F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>GPS: Medico Veterinario L.P., Modena, Italia

<sup>2</sup>Marcello Bresaola, Luca Ciucci: Soc. Agr. La Pellegrina, Quinto di Valpantena (VR)

<sup>3</sup>Patrizia Pesente, Fabio Perini : Laboratorio Tre Valli - Gruppo Veronesi, S. Martino B.A., Verona, Italia

<sup>4</sup>Maria Elisabetta Tecli: Veronesi Verona (VR)

**Parole chiave:** Eradicazione della PRRS, "Wean & Removal", Real Time RT-PCR , Sierologia.

**Key Words:** PRRS Eradication , "Wean & Removal", Real Time RT-PCR , Serology.

### Riassunto

Gli autori descrivono lo studio e la realizzazione di un programma di eradicazione della PRRS, in un allevamento di scrofe del centro Italia utilizzando la tecnica del "Wean & Removal".

### Abstract

The authors describe the set up and realization of a PRRS eradication program using the Wean & removal technique in a sow herd located in central Italy

### INTRODUZIONE

La sindrome riproduttiva respiratoria suina (PRRS) è ancora probabilmente, dal punto di vista economico, la malattia più rilevante nell'industria suinicola a livello mondiale. In accordo con Pesente *et al.*, 2006<sup>1</sup>, si considera che la variabilità dei ceppi italiani possa essere la causa principale della difficoltà di controllo della malattia in campo. In una scrofaia del centro Italia PRRS negativa ("sito 1" la cui produzione confluiva in svezzamento con quella di un'altra scrofaia a formare un'unica filiera produttiva ) a partire da gennaio 2024 si è manifestato un episodio di PRRS, che ha causato diversi aborti ed aumento della mortalità in sala parto. La produzione di suinetti ha subito significative perdite e si è ritornati a livelli normali solo nella seconda parte del 2024 quando la scrofaia si è stabilizzata dal punto di vista clinico. Al fine di negativizzare tutta la produzione di questa "filiera mista" nella primavera/estate del 2025 è stato deciso di iniziare un programma di eradicazione di PRRS nella scrofaia in questione che era rimasta sierologicamente PRRS positiva.

In base a esperienze passate, a partire da maggio 2025, è stato deciso di usare la tecnica conosciuta come "Wean & Removal"<sup>3</sup> quale strumento per arrivare alla negativizzazione della filiera come già descritto da Scott Dee<sup>4</sup> negli U.S.A.

### MATERIALI E METODI

Dopo un prelievo trasversale esplorativo effettuato il 05 maggio 2025 ( 63% di animali sierologici positivi con s/p medio di 0,81 e Dev.St 0,268 ) si è definito il valore soglia di s/p per la esclusione/ritenzione delle scrofe che sarebbero state successivamente testate utilizzando il test ELISA per PRRS (IDEXX HerdChek®. Questo valore soglia è stato fissato come s/p = 1 per cui tutti gli animali con valori s/p > 1 sarebbero stati eliminati. Per non appesantire il

lavoro diagnostico del Laboratorio e per contenere i costi di analisi è stato deciso che la PCR per PRRS sarebbe stata eseguita solo nel 30% circa dei campioni prelevati raggruppandoli in pool di 5 sieri. Per evitare di tralasciare eventuali positivi si è deciso deliberatamente di usare una tecnica “molto sensibile” quale la Real time RT-PCR invece della convenzionale One-step RT-PCR.

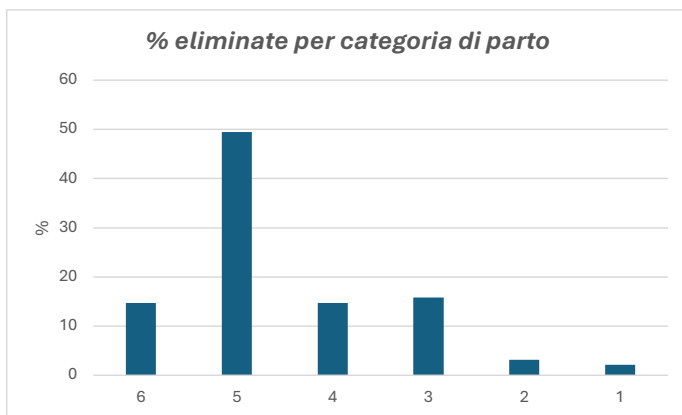
In pratica a tutte le 700 scrofe dell’allevamento è stato prelevato il sangue in sala parto dalla vena mammaria in 8 sessioni con intervalli di circa 28 giorni tra una e l’altra con inizio il 19 maggio 2025. Ultima sessione di prelievi il 22 settembre 2025.

Sei degli otto gruppi di sangue prelevati nelle varie sessioni sono stati analizzati nel Laboratorio Tre Valli che ha eseguito sia la sierologia, utilizzando il test ELISA per PRRS IDEXX HerdChek®, che le PCR (PRRSV EU-NA Real Time RT-PCR con kit Life Technologies). L’RNA virale è stato estratto da sieri e da un controllo positivo, utilizzando l’RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germania) in accordo con le istruzioni del produttore e l’estratto è stato infine risospeso in 100 ml di acqua priva di nucleasi.

Per ragioni logistiche i campioni di due degli otto gruppi prelevati sono stati analizzati nel Laboratorio IZS Umbria e Marche, sede di Perugia che ha comunque utilizzato lo stesso kit sierologico PRRS IDEXX HerdChek®.

## RISULTATI

Solo 95 dei 700 campioni di sangue testati - pari al 13,57 % del totale prelevato - hanno mostrato valori superiori al valore soglia designato (s/p 1,0) portando quindi alla successiva eliminazione delle scrofe al momento della svezzata. Nessuna delle 40 PCR eseguite – ciascuna composta da un pool di 5 sieri per un totale di 200 sieri analizzati – è mai risultata positiva. Nel periodo in oggetto sono anche stati eseguite PCR occasionali su materiali quali pool di polmoni di suinetti deceduti in sala parto e Processing Fluids (emosieri) raccolti al momento della castrazione. Tutti i materiali sottoposti a test sono sempre risultati PCR negativi. Il seguente grafico (Graf. 1) mostra la distribuzione per categoria di parto delle scrofe con valori di s/p >1 e quindi eliminate.



Per confermare che – una volta terminato il programma di Wean & Removal – non ci fosse stata circolazione virale e/o sieroconversione tra le scrofe rimaste in allevamento 60 scrofe sono state oggetto di un ulteriore prelievo trasversale in data 21 ottobre 2025 ovvero un mese circa dopo l’ultima seduta di prelievi. Solo una scrofa ha mostrato un valore di s/p superiore a 1,0 ( s/p 1,29) ed è stata eliminata in via precauzionale. Tutte le restanti 59 avevano valori di s/p minori o uguali a quelli registrati ai precedenti prelievi. Un ulteriore prelievo trasver-

sale e casuale di 20 scrofe è stato eseguito il 13 febbraio 2026 (circa 150 giorni dall'ultimo prelievo); 19 i campioni negativi e solo un campione è risultato positivo ma comunque con un valore di s/p pari a uno.

Tutte le scrofette introdotte come rimonta da maggio-giugno 2025 sono rimaste sierologicamente negative ai controlli.

Un altro "criterio"/metodo utilizzato per verificare il buon esito del programma è la sierologia di fine ciclo svezzamento eseguita su soggetti provenienti dalle due scrofaie che compongono la filiera. In realtà i primi cicli testati e risultati sierologicamente negativi risalgono a fine 2024/inizio 2025 a testimonianza della avvenuta stabilizzazione ma - anche tutti i successivi fino all'ultimo di metà gennaio '26 - sono risultati sierologicamente negativi.

## **DISCUSSIONE**

La tecnica di risanamento da PRRSV mediante Wean & Removal si è dimostrata ancora una volta tecnicamente fattibile ed economicamente sostenibile per quanto riguarda i costi di analisi e i costi derivanti dalla eliminazione delle scrofe (90 pari al 13,6% del parco scrofe). Al momento di scrivere siamo ormai a circa cinque mesi dalla conclusione del piano e i risultati sono confortanti tuttavia è ovvio che il programma si potrà dire completamente realizzato quando tutte le scrofe restanti e le nuove scrofe introdotte come rimonta risulteranno sierologicamente negative a futuri prelievi così come i suinetti svezzati e destinati alla successiva fase di svezzamento.

## **CONCLUSIONE**

Come questo studio di campo conferma, lo schema di campionamento e di analisi e l'applicazione rigida del 'wean and removal' sono ancora un metodo efficace quando si voglia perseguire l'obiettivo della eradicazione prrs ed il mantenimento di una situazione stabile"

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Pesente P., Rebonato V., Sandri GP., Giovanardi D., Sperati Ruffoni L., Torriani S. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet Microbiol* May 2006 31;114(3-4):214-24.
2. Sandri GP., Giovanardi D., Pesente P., Sperati-Ruffoni L., Piemonti D. PRRSV airborne transmission. Not only a theoretical event. A documented case in the real world. *Proceedings of the 19th IPVS Congress – Copenhagen July 16-19 2006*
3. Sandri GP. PRRS eradication by Wean & Removal in two large sow units working in a multisite system in northern Italy. Can we call it a success? *International Symposium on Swine Disease Eradication - University of Minnesota Swine Disease Eradication Center, Minneapolis, Sept. 2001*
4. Dee, S.A. 2003. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 30 farms by test and removal. *J Swine Health Prod.* 12(3):129-133

# EXPERT KNOWLEDGE ELICITATION PER UN PERCORSO DIAGNOSTICO APPROPRIATO: FATTORI DI RISCHIO NEL COMPLESSO DELLA SINDROME RESPIRATORIA DEL SUINO

## *EXPERT KNOWLEDGE ELICITATION FOR AN APPROPRIATE DIAGNOSTIC APPROACH PROTOCOL: RISK FACTORS IN PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX*

MAISANO A. M.<sup>1</sup>, SCALI F.<sup>1</sup>, OSSOLA M.<sup>1</sup>, ROMEO C.R.<sup>1</sup>, SANTUCCI G.<sup>1</sup>, TONNI M.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>, CORDIOLI B.<sup>1</sup>, MERENDA M.<sup>2</sup>, VIO D.<sup>2</sup>, USTULIN M.<sup>2</sup>, PANICCIÀ M.<sup>3</sup>, PIERSANTI F.<sup>3</sup>, CATANIA S.<sup>2</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER);

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe);

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM).

**Parole chiave:** EKE, appropriatezza diagnostica, PRDC

**Key words:** EKE, diagnostic appropriateness, PRDC

### **Riassunto**

Il complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC) rappresenta una delle principali problematiche della suinicoltura. Tuttavia, il peso dei singoli fattori che possono influenzare la PRDC non è ancora del tutto chiaro e tale incertezza può ostacolare l'appropriatezza diagnostica. Lo scopo di questo studio è affrontare tale incertezza attraverso l'*Expert Knowledge Elicitation* (EKE). L'EKE ha coinvolto 19 esperti che hanno valutato 15 fattori in relazione agli agenti eziologici primari e secondari della PRDC. Dall'EKE è emerso un consenso elevato nell'identificazione dei driver critici: l'allevamento a flusso continuo, l'elevata densità animale, concentrazioni nocive di gas ambientali, assenza di vaccinazioni e stato della PRRS (positivo e non vaccinato o sconosciuto). Al contrario, l'adozione del "tutto pieno - tutto vuoto" per allevamento, corrette procedure di pulizia e disinfezione con rigoroso rispetto del vuoto sanitario, parametri microclimatici ottimali e la presenza di piani vaccinali adeguati sono risultati i fattori di minor rischio. Un'indagine *risk-based*, ponderata sui principali fattori strutturali e manageriali, può rappresentare uno strumento chiave per la gestione della PRDC. Integrando tale valutazione con i dati clinici è possibile orientare il percorso diagnostico dal campionamento alla selezione dei test, contribuendo a stabilire una *roadmap* diagnostica appropriata per l'identificazione di tutti i potenziali patogeni.

### **Abstract**

Porcine respiratory disease complex (PRDC) is one of the biggest issues in pig farming. However, the extent to which individual factors can influence PRDC is not yet well understood, and this uncertainty could hinder accurate diagnosis. This study aims to address this uncertainty through Expert Knowledge Elicitation (EKE). The EKE involved 19 experts who evaluated 15 factors related to the primary and secondary aetiological agents of PRDC. The EKE revealed high consensus on critical drivers, including continuous flow housing, high stocking density, harmful environmental gas concentrations, lack of vaccination and PRRS status (positive and unvaccinated or unknown). Conversely, the adoption of 'all-in, all-out' at farm-level, proper cleaning and disinfection procedures

with strict adherence to sanitary void, optimal microclimatic parameters and adequate vaccination plans were found to pose the lowest risk. A risk-based survey that considers the main structural and management factors could be a valuable tool to address PRDC. Integrating this assessment with clinical data could guide the diagnostic process, from sampling to test selection, helping to establish an appropriate roadmap for identifying all potential pathogens involved.

## INTRODUZIONE

Il concetto di **appropriatezza** in medicina, consolidatosi in ambito umano a partire dagli anni '90, si riferisce all'adozione di procedure diagnostiche o terapeutiche in grado di massimizzare il beneficio clinico per il paziente, riducendo al contempo i rischi e gli sprechi di risorse (Brook et al., 1986; Brook, 1994). L'appropriatezza, così intesa, deriva direttamente dalla *Evidence-Based Medicine*, approccio essenziale per lo sviluppo di percorsi clinici standardizzati atti a bilanciare l'efficacia delle cure con la sostenibilità economica dei sistemi sanitari (Bozic et al., 2004).

In medicina veterinaria l'adozione dell'appropriatezza diagnostica e terapeutica è divenuta essenziale, in particolare nel caso degli animali da reddito. L'industrializzazione dei sistemi produttivi, caratterizzata da elevate densità animali e dalla pressione di agenti patogeni opportunisti, aumenta il rischio di malattia e richiede strumenti che garantiscano la migliore assistenza possibile (Alonso et al., 2020). Il veterinario aziendale, centrale per la salute pubblica anche secondo la *Animal Health Law* (Reg. UE 2016/429), necessita di avere a disposizione protocolli diagnostici omogenei e riproducibili per affrontare la complessità clinica di forme morbose come la PRDC con soluzioni gestionali a lungo termine, sostenibili e basate su evidenze.

### *Il Complesso delle Malattie Respiratorie del Suino (PRDC)*

La *porcine respiratory disease complex* (PRDC) rappresenta una delle maggiori problematiche per il settore suinicolo globale. La patologia ha un'origine multifattoriale, risultato dell'interazione tra agenti infettivi (primari e secondari), stress ambientali e carenze gestionali (Leman et al., 1992; Martelli et al., 2013). Fattori predisponenti quali ventilazione inadeguata, sovraffollamento e sbalzi climatici esacerbano la suscettibilità degli animali ai diversi agenti eziologici, in particolare nelle fasi di crescita e ingrasso (8-26 settimane), durante le quali lo stress biologico è già intrinsecamente elevato (Campbell et al., 2013). La PRDC può colpire fino al 70% dei suini di un allevamento, con tassi di mortalità che oscillano tra il 2% e il 20%, determinando gravi perdite economiche derivanti dal costo dei trattamenti, dalla mortalità ed dalla riduzione degli incrementi ponderali (Ruggeri et al., 2020). La patogenesi di questo complesso coinvolge una vasta gamma di agenti eziologici (Tabella 1), la cui azione combinata è in grado di superare le barriere immunitarie innate del suino (Poli et al., 2005; Marcato, 2002).

**Tabella 1** - Agenti eziologici primari e secondari di *porcine respiratory disease complex* (PRDC) (classificazione modificata da Sarli et al., 2021).

**Table 1** - Primary and secondary aetiological agents of porcine respiratory disease complex (PRDC) (modified from Sarli et al., 2021).

Agenti eziologici primari	Agenti eziologici secondari
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Porcine Circovirus type 2 (PCV-2)	<i>Pasteurella multocida</i>
Influenza A Virus (IAV)	<i>Haemophilus parasuis</i>
Aujeszky's Disease / Pseudorabies Virus (AD/PRV)	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
	<i>Trueperella pyogenes</i>
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>

### *Il sistema "Dia-pacemaker"*

Il sistema **Dia-pacemaker** è stato sviluppato per fornire ai veterinari uno strumento di supporto finalizzato a garantire l'appropriatezza diagnostica. Dia-pacemaker integra un algoritmo decisionale volto ad assistere il veterinario nella scelta dei test più idonei per l'identificazione della PRDC, tenendo conto anche di fattori non strettamente legati all'agente eziologico. Data la natura multifattoriale della PRDC, l'appropriatezza diagnostica non può limitarsi all'individuazione dei patogeni che circolano nelle diverse fasi di vita dei suini, ma deve anche considerare i fattori predisponenti (Sarli et al., 2021). Per la definizione dell'algoritmo decisionale alla base del sistema, è stato applicato un processo di valutazione del rischio mediante consultazione di esperti, secondo le linee guida EFSA sull'**Expert Knowledge Elicitation (EKE)** (EFSA, 2014). Lo scopo del presente lavoro è di descrivere il processo di EKE adottato nell'ambito di Dia-pacemaker ed i risultati da esso ottenuti.

### **MATERIALI E METODI**

Per lo svolgimento dell'EKE sono stati invitati 21 esperti con *background* professionali differenti. In particolare, sei veterinari provenienti dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (I.I.Z.S.), sette accademici ed otto liberi professionisti. Agli esperti è stato richiesto di compilare un questionario per i differenti patogeni primari e secondari riportati in Tabella 1, utilizzando un protocollo Delphi modificato (EFSA, 2014) relativo ai fattori manageriali e strutturali di allevamento che possono predisporre la comparsa di PRDC nel suino. Per l'EKE sono stati considerati 15 pericoli, suddivisi in tre macrocategorie: caratteristiche aziendali (2), strutture e management (8) e anamnesi (5); in Tabella 2 sono riportati i dettagli dei pericoli considerati, classificati per differenti soglie, con indicazione del pericolo relativo e dei possibili effetti avversi.

**Tabella 2** - Struttura del questionario utilizzato per l'*Expert Knowledge Elicitation* (EKE) sulla *porcine respiratory disease complex* (PRDC): elenco dei fattori considerati, con le soglie di risposta previste, il pericolo associato e i possibili effetti avversi sulla PRDC.

**Table 2** - Structure of the questionnaire used for the Expert Knowledge Elicitation (EKE) on porcine respiratory disease complex (PRDC): list of factors considered, along with the predefined response levels, associated hazards, and potential adverse effects on PRDC.

Domanda	Pericolo e/o descrizione	Soglia-Risposta	Effetti avversi
<b>Caratteristiche aziendali</b>			
1. Orientamento produttivo (Alta capacità ≥ 300 suini; Bassa capacità < 300 suini)	Maggiore densità di popolazione con maggiore probabilità di diffusione del patogeno / possibile contatto con fauna selvatica	Stabulato alta capacità Stabulato bassa capacità Semibrado alta capacità Semibrado bassa capacità	Trasmissione dei patogeni / introduzione del patogeno
2. Tipologia di allevamento	Introduzione di patogeni da soggetti in diverse fasi di vita	Riproduzione ciclo chiuso Riproduzione ciclo aperto Svezzamento Ingrasso Svezzamento + Ingrasso	Trasmissione, introduzione, diffusione e mantenimento forme respiratorie
<b>Strutture e management</b>			
3. Provenienza degli animali (ultimi 2 anni solari)	Introduzione del patogeno	Sempre dal medesimo fornitore (sempre dal medesimo allevamento negli ultimi 2 anni) Da differenti fornitori (da due o più allevamenti diversi durante gli ultimi 2 anni, anche se uno per ciclo)	Introduzione di nuovi agenti patogeni/ceppi differenti
4. Modalità di allevamento dei suini	Introduzione di patogeni da soggetti in diverse fasi di vita e/o da diversi settori dell'allevamento	Flusso continuo Tutto pieno - tutto vuoto per stanza Tutto pieno - tutto vuoto per capannone Tutto pieno - tutto vuoto per allevamento	Trasmissione, introduzione, diffusione e mantenimento forme respiratorie
5. Procedure di pulizia e disinfezione	Permanenza patogeno nell'ambiente	Assenti o non appropriate (assenza di una o più fasi tra: vuoto biologico, lavaggio, disinfezione, asciugatura, vuoto sanitario) Presenti, ma approssimative nelle tempistiche del vuoto sanitario (2-6 gg) Presenti con ottimo rispetto delle tempistiche di vuoto sanitario (≥7gg)	Trasmissione degli agenti patogeni nei diversi cicli ed effetto sulla carica ambientale
6. Libertà di movimento - densità di stabulazione	Maggiore densità di popolazione con maggiore probabilità di contatto e diffusione del patogeno / stress da competizione	Limitata, situazione a densità elevata Adeguate, situazione a densità accettabile Ottimale, situazione a densità bassa	Trasmissione dei patogeni
7. Qualità dell'aria: sistemi di ventilazione	Ventilazione, flussi d'aria, temperatura, UR non corretti in funzione delle esigenze dell'animale e del clima	Naturale Naturale con regolazione manuale Naturale con regolazione automatica Meccanica / forzata	Predisposizione all'insorgenza di forme cliniche
8. Qualità dell'aria: verificare la presenza dei gas nocivi al momento della ispezione con apposita attrezzatura	Infiammazione delle vie respiratorie	Qualità nociva: >20 ppm NH <sub>3</sub> e/o >3000 ppm CO <sub>2</sub> e/o >0,5 ppm H <sub>2</sub> S Qualità accettabile: 10-20 ppm NH <sub>3</sub> e <3000 ppm CO <sub>2</sub> e <0,5 ppm H <sub>2</sub> S Qualità ottimale: <10 ppm NH <sub>3</sub> e <3000 ppm CO <sub>2</sub> e <0,5 ppm H <sub>2</sub> S	Predisposizione all'insorgenza di forme cliniche
9. Qualità dell'aria e isolamento delle strutture: Temperatura (T) e Umidità Relativa (UR)	T e UR non corretti in funzione delle esigenze dell'animale e del clima	T e UR inferiore al Limite Critico Basso T e UR nella zona di termo-neutralità T e UR superiore al Limite Critico Alto	Predisposizione all'insorgenza di forme cliniche
10. Separazione dei box o recinti	Diffusione del patogeno per contiguità	Assente o con possibilità di contatto fisico e diretto con suini dei box o recinti adiacenti (es. sbarre) Presente in muratura o altro materiale occludente (assenza di contatto fisico diretto)	Trasmissione, introduzione e diffusione forme respiratorie

<i>Anamnesi</i>			
11. Stato dell'allevamento per PRRS per allevamento da ingrasso	Mancata gestione e possibile introduzione del virus della PRRS	Non conosciuto Positivo (PCR <i>wild-type</i> + ed ELISA + ed PCR <i>mlvax</i> +/-) Sieropositivo, non eliminatore (PCR <i>wild-type</i> - ed ELISA + e PCR <i>mlvax</i> -) Vaccinato (PCR <i>wild-type</i> - ed ELISA + e	Trasmissione, introduzione - diffusione forme respiratorie
12. Stato vaccinale della popolazione colpita	Ridotta capacità di risposta immunitaria e/o maggior suscettibilità all'infezione	Nessun vaccino PRRS <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> PCV-2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Influenza A <i>Streptococcus suis</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> Malattia di Aujeszky <i>Bordetella bronchiseptica</i> e <i>Pasteurella multocida</i> <i>Glaesserella parasuis</i> Stabulogeno	Insoergenza di forme cliniche
13. Diagnosi di malattia pregressa sostenuta dai seguenti patogeni negli ultimi 12 mesi con presenza di un referto di laboratorio che riporti la presenza del patogeno	Presenza del patogeno	Analisi non disponibili PRRS <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> PCV-2 forma sub-clinica PCV-2 forma sistemica <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Mycoplasma hyorinis</i> Influenza A <i>Streptococcus suis</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> Malattia di Aujeszky <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Glaesserella parasuis</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>T. pyogens</i> <i>Mycobacterium spp.</i> Pneumocistis Metastrogili Larva migrans da <i>Ascaris suum</i> Analisi non disponibili	In presenza del patogeno si ha un maggior rischio che si ripresenti lo stesso o ne sopraggiungano altri
14. Score polmonare negli ultimi 12 mesi	Scarsa gestione preventiva della PRDC	Disponibile Non disponibile	Permanenza del patogeno
15. Trattamenti antibiotici in corso nel gruppo colpito dall'evento morboso	Presenza del patogeno	No, nessun trattamento in corso Sì	Trasmissione, diffusione, aggravamento sintomatologico delle forme respiratorie

Il processo di EKE è stato completato attraverso due consultazioni (*round*):

- *Prima consultazione*: compilazione del questionario con valutazione dei pericoli in relazione alla PRDC per ciascun agente eziologico; al termine, agli esperti è stato chiesto di riconsiderare i punteggi dopo alcuni giorni per confermarne la coerenza;
- *Seconda consultazione*: i risultati della prima consultazione (mediana dei punteggi attribuiti dal gruppo di esperti) sono stati resi noti agli esperti; a ciascun esperto è stata data la possibilità di revisionare le proprie valutazioni, al fine di favorire il raggiungimento di un consenso.

Inoltre, nel corso della prima consultazione, gli esperti hanno espresso un punteggio di “percezione del rischio” per ciascun pericolo presente in elenco. Tale valore è stato assegnato considerando, in base alla propria esperienza e conoscenza, la potenzialità del pericolo di causare l’insorgenza di PRDC. Il punteggio di percezione del rischio è stato assegnato in due *step*:

1. Definizione della rilevanza del pericolo nel causare malattia respiratoria. Qualora il pericolo non avesse alcuna rilevanza, veniva assegnato il punteggio 0, in caso contrario, la valutazione del pericolo proseguiva con lo *step* successivo.
2. Assegnazione di un punteggio di “percezione del rischio”, compreso tra 1 e 10, per ciascuno dei pericoli e relative soglie. Il punteggio considerava i seguenti aspetti: probabilità, gravità e durata dell’effetto avverso sulle forme respiratorie.

I risultati delle valutazioni sono stati raccolti in un database Microsoft Excel (Microsoft Corp, Redmond WA, USA) considerando la mediana di tali valutazioni come criterio per la classificazione dei fattori inclusi nell’EKE. Per valutare il consenso tra gli esperti, è stata inoltre calcolata la variazione totale (TotVar) delle risposte e confrontata tra le due consultazioni. La TotVar è stata calcolata sommando la deviazione di ciascun partecipante dalla mediana. Il grado di avvicinamento al consenso è stato valutato attraverso la riduzione della varianza tra la prima e la seconda consultazione; pertanto, maggiore è la riduzione di tale varianza, maggiore è l’avvicinamento al consenso.

## **RISULTATI**

L’EKE è stato completato da 19 esperti (6 provenienti da II.ZZ.SS., 6 accademici, 7 liberi professionisti) su 21 coinvolti (90,5%). I risultati sono riportati in Tabella 3 e Tabella 4.

Tabella 3 riporta tutti i fattori in cui è stata riscontrata la più alta percezione del rischio (un punteggio  $\geq 8$  per almeno un patogeno primario), mentre Tabella 4 mostra quelli con la percezione più bassa (un punteggio  $\leq 4$  per almeno un patogeno primario). Per ciascun patogeno è riportato il punteggio medio attribuito dagli esperti e la variazione totale delle valutazioni tra la prima e la seconda consultazione (TotVar).

**Tabella 3** - Risultati dell'*Expert Knowledge Elicitation* (EKE) per la *porcine respiratory disease complex* (PRDC): fattori di rischio (strutturali, gestionali, anamnestici) con la più elevata percezione di rischio, mediana dei punteggi per agente eziologico e relativa variazione (TotVar) tra la prima e la seconda valutazione degli esperti.

**Table 3** - Expert Knowledge Elicitation (EKE) results for porcine respiratory disease complex (PRDC): risk factors (structures, management, anamnesis) with the **highest perceived risk**, median score for each aetiological agent and variability (TotVar) between the first and second expert assessments.

Domanda	Soglia-Risposta	PRRSV <sup>1</sup> (TotVar)	IAV <sup>2</sup> (TotVar)	AD/PRV <sup>3</sup> (TotVar)	PCV-2 <sup>4</sup> (TotVar)	M.hyo <sup>5</sup> (TotVar)	APP <sup>6</sup> (TotVar)	Pat Sec <sup>7</sup> (TotVar)
1. Orientamento produttivo (Alta capacità ≥ 300 suini; Bassa capacità < 300 suini)	Stabulato alta capacità	8 (19-16)	8 (22-20)	8 (40-38)	7 (35-32)	7 (36-33)	7 (29-27)	7 (28-27)
	Riproduzione ciclo aperto	8 (31-28)	7 (30-24)	5 (40-32)	6 (32-26)	7 (37-36)	7 (27-24)	6,5 (36,5-21)
2. Tipologia di allevamento	Svezamento	8 (22-19)	7 (34-27)	3 (40-32)	7 (34-27)	6 (31-30)	5 (35-34)	6,5 (40,5-26)
3. Provenienza degli animali (negli ultimi 2 anni solari)	Da differenti fornitori (≥2 allev. diversi negli ultimi 2 anni, anche se 1 per ciclo)	8 (20-17)	7 (32-31)	7 (38-36)	6 (40-39)	7 (33-29)	7 (27-27)	7 (30-30)
4. Modalità di allevamento dei suini	Flusso continuo	9 (13-13)	8 (23-23)	8 (28-28)	9 (29-25)	8 (27-24)	8 (24-21)	8 (24-19)
5. Procedure di pulizia e disinfezione	Assenti o non appropriate: vuoto biologico, lavaggio, disinfezione, asciugatura, vuoto sanitario	8 (26-24)	8 (39-37)	6 (44-34)	8 (40-33)	7 (30-28)	8 (22-19)	8 (19-17)
6. Libertà di movimento - densità di stabulazione	Limitata, situazione a densità elevata	8 (22-22)	9 (24-24)	8 (28-21)	8 (38-29)	8 (20-20)	8 (15-15)	8 (18-17)
8. Qualità dell'aria (verificata con apposita attrezzatura)	Qualità nociva: >20 ppm NH <sub>3</sub> e/o >3000 ppm CO <sub>2</sub> e/o >0,5 ppm H <sub>2</sub> S	8 (29-26)	8 (32-28)	8 (43-30)	6 (35-29)	9 (25-18)	8 (25-20)	8 (17-14)
10. Separazione dei box o recinti	Nessuna o possibilità di contatto fisico diretto con suini di box/recinti adiacenti	8 (28-24)	8 (34-28)	8 (34-29)	8 (32-26)	8 (24-22)	8 (25-23)	8 (26-20)
11. Stato dell'allevamento per PRRS per allevamento da ingrasso	Non conosciuto	9 (21-19)	8 (24-19)	8 (38-27)	8 (30-24)	8 (24-22)	8 (22-20)	8 (20-18)
	Positivo (PCR <sup>wild-type+</sup> ed ELISA <sup>+</sup> e PCR <sup>mhax+/-</sup> )	9 (28-19)	8 (24-19)	6 (37-31)	8 (31-23)	8 (31-25)	8 (31-25)	8 (27-22)
12. Stato vaccinale della popolazione colpita	Nessun vaccino	9 (41-23)	8 (47-17)	8 (47-23)	8,5 (44,5-19)	9 (47-17)	7 (40-15)	7 (51-19)
13. Diagnosi di malattia negli ultimi 12 mesi con referto di laboratorio che riporti la presenza del patogeno	Analisi non disponibili	8 (29-16)	7 (49-32)	8 (46-30)	7 (41-23)	7 (44-22)	7 (41-23)	8 (57-20)
	PRRS	8 (33-23)	-	-	-	-	-	-
	Malattia di Aujeszky	-	-	8 (48-35)	-	-	-	-
	<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	8 (38-24)
14. Score polmonare negli ultimi 12 mesi	Non disponibile	7 (40-32)	5 (39-32)	5 (41-32)	5 (43-32)	8 (27-20)	8 (27-20)	7 (44-38)
15. Trattamenti antibiotici in corso nel gruppo colpito dall'evento morboso	No, nessun trattamento in corso	6 (45-34)	5 (44-31)	5 (47-33)	4,5 (48,5-35)	8 (34-23)	8 (27-15)	8 (29-16)

1. PRRSV = Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

2. IAV = Influenza A Virus

3. AD/PRV = Aujeszky's Disease / Pseudorabies Virus

4. PCV-2 = Porcine Circovirus type 2

5. M.hyo = *Mycoplasma hyopneumoniae*

6. APP = *Actinobacillus pleuropneumoniae*

7. Pat Sec = patogeni secondari

**Tabella 4** - Risultati dell'*Expert Knowledge Elicitation* (EKE) per la *porcine respiratory disease complex* (PRDC): fattori di rischio (strutturali, gestionali, anamnestici) con la più **bassa percezione di rischio**, mediana dei punteggi per agente eziologico e relativa variazione (TotVar) tra la prima e la seconda valutazione degli esperti.

**Table 4** - Expert Knowledge Elicitation (EKE) results for porcine respiratory disease complex (PRDC): risk factors (structures, management, anamnesis) with the **lowest perceived risk**, median score for each aetiological agent and variability (TotVar) between the first and second expert assessments.

Domanda	Soglia-Risposta	PRRSV <sup>1</sup> (TotVar)	IAV <sup>2</sup> (TotVar)	AD/PRV <sup>3</sup> (TotVar)	PCV-2 <sup>4</sup> (TotVar)	M.hyo <sup>5</sup> (TotVar)	APP <sup>6</sup> (TotVar)	Pat Sec <sup>7</sup> (TotVar)
1. Orientamento produttivo (Alta capacità ≥ 300 suini; Bassa capacità < 300 suini)	Sembrado bassa capacità	3 (31-21)	4 (40-24)	5 (39-25)	3 (32-27)	3,5 (30,5-22)	2,5 (27,5-17)	3,5 (27,5-21)
2. Tipologia di allevamento	Svezamento	8 (22-19)	7 (34-27)	3 (40-32)	7 (34-27)	6 (31-30)	5 (35-34)	6,5 (40,5-26)
3. Provenienza degli animali (ultimi 2 anni solari)	Stesso fornitore (sempre dal medesimo allevamento negli ultimi 2 anni)	4 (24-24)	4 (23-22)	2 (23-20)	3 (20-19)	4 (26-25)	3 (21-19)	3 (33-30)
4. Modalità di allevamento dei suini	Tutto pieno - tutto vuoto per allevamento	2 (17-17)	3 (17-17)	2 (17-16)	2 (22-21)	2 (22-21)	2 (12-12)	2 (17-17)
5. Procedure di pulizia e disinfezione	Presenti con ottimo rispetto delle tempistiche di vuoto sanitario (≥7gg)	2 (20-19)	3 (21-21)	2 (29-25)	2 (21-20)	2 (19-19)	2 (20-19)	2 (19-18)
6. Libertà di movimento - densità di stabulazione	Ottimale, situazione a densità bassa	3 (34-21)	4 (45-32)	3 (39-27)	3 (31-20)	3 (35-22)	3 (31-22)	3 (33-22)
8. Qualità dell'aria (verificata con apposita attrezzatura)	Qualità ottimale: <10 ppm NH <sub>3</sub> e <3000 ppm CO <sub>2</sub> e <0,5 ppm H <sub>2</sub> S	2 (29-22)	2 (29-22)	2 (24-21)	2 (24-22)	2 (22-21)	2 (20-19)	2 (21-20)
9. Qualità dell'aria e isolamento delle strutture: Temp. e Umidità Relativa	Temperatura e UR nella zona di termonutralità	3 (31-30)	2 (31-26)	2 (26-25)	3 (27-25)	3 (25-23)	3 (25-24)	2 (28-28)
10. Separazione dei box o recinti	Presente muratura o altro materiale occludente (assenza di contatto fisico)	4 (36-30)	4 (37-33)	3 (24-23)	3 (23-23)	3 (19-19)	3 (20-17)	3 (18-16)
11. Stato PRRS per allevamento da ingrasso	Vaccinato (PCR <sub>wild-type</sub> - ed ELISA+ e PCR <sub>mlvax+</sub> )	4 (25-23)	4 (25-22)	3 (26-24)	4 (25-21)	4 (29-24)	4 (29-24)	4 (26-21)
	Negativo (PCR <sub>wild-type</sub> - ed ELISA- e PCR <sub>mlvax-</sub> )	3 (51-38)	3 (43-32)	3 (44-32)	5 (47-35)	5 (43-32)	3 (40-31)	3 (40-31)
12. Stato vaccinale della popolazione colpita	Influenza A	-	3 (35-28)	-	-	-	-	-
	Malattia di Aujeszky	-	-	2 (36-29)	-	-	-	-
	PCV-2	-	-	-	3 (31-27)	-	-	-
	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	-	-	3 (31-24)	-	-
	APP	-	-	-	-	-	3,5 (30,5-24)	-
14. Score polmonare negli ultimi 12 mesi	<i>Bordetella bronchiseptica</i> e <i>Pasteurella multocida</i>	-	-	-	-	-	-	3 (30-24)
	Disponibile	4 (28-25)	4 (30-27)	4 (32-29)	3 (26-23)	4 (28-28)	4 (30-30)	3 (27-26)
15. Trattamenti antibiotici in corso nel gruppo colpito dall'evento morboso	Si	4 (33-28)	3 (43-36)	3 (43-35)	3 (32-27)	3,5 (24,5-20)	3 (22-18)	3 (18-15)

1. PRRSV = Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
2. IAV = Influenza A Virus
3. AD/PRV = Aujeszky's Disease / Pseudorabies Virus
4. PCV-2 = Porcine Circovirus type 2
5. M.hyo = *Mycoplasma hyopneumoniae*
6. APP = *Actinobacillus pleuropneumoniae*
7. Pat Sec = patogeni secondari

## DISCUSSIONE

Nel presente studio è stata effettuata un'EKE, tramite metodo Delphi modificato, che ha coinvolto 19 esperti nella valutazione di 15 fattori associati alla PRDC, identificando sia i fattori di rischio che quelli protettivi, al fine di ottimizzare i percorsi diagnostici. Tra la prima e la seconda consultazione si è registrato un incremento del consenso che, di conseguenza, ha determinato un'evidente riduzione della variabilità dei giudizi per la maggior parte dei fattori di rischio (Tabella 3 e 4). I punteggi medi di rischio non hanno mai raggiunto gli estremi della scala (0 o 10), suggerendo un'attenta calibrazione dell'incertezza in un contesto complesso come quello della PRDC nell'allevamento intensivo suino. Tale risultato è coerente anche con le linee guida EFSA sull'EKE, che sottolineano l'importanza del giudizio degli esperti per mitigare l'incertezza scientifica (EFSA, 2014). Inoltre, questo approccio rientra nel paradigma dell'appropriatezza, finalizzato a bilanciare efficacia clinica, rischi e sostenibilità economica dei protocolli (Brook et al., 1986; Brook, 1994; Bozic et al., 2004).

### *Fattori ad alto rischio: PRDC e Management*

Gli elevati rischi associati all'allevamento a flusso continuo ed all'alta densità animale, che limita significativamente la libertà di movimento dei suini, trovano ampio riscontro nella letteratura sulla PRDC. La limitazione del movimento non rappresenta solo un problema di benessere animale (Direttiva 2008/120/CE; Alonso et al., 2020), ma costituisce anche un fattore in grado di alterare l'omeostasi immunitaria, rendendo i suini più suscettibili ad agenti infettivi (Poli et al., 2005). I risultati dell'EKE confermano che la combinazione di fattori ambientali e sanitari svolge un ruolo centrale nell'epidemiologia della PRDC. In particolare, gli esperti hanno indicato un rischio massimo quando la qualità dell'aria è insufficiente ( $\text{NH}_3 > 20$  ppm;  $\text{CO}_2 > 3000$  ppm) in un allevamento positivo alla PRRS (o il cui stato non è noto). Come riportato in un precedente studio italiano, esiste una stretta associazione tra agenti infettivi e lesioni polmonari nei suini all'ingrasso, dove la PRRS agisce spesso come trigger primario (Ruggeri et al., 2020). L'assenza di piani vaccinali in popolazioni colpite da ceppi *wild-type* di PRRS induce la massima vulnerabilità. La letteratura sottolinea che, senza immunizzazione, il controllo delle malattie respiratorie e sistemiche diventa pressoché impossibile in contesti con elevata pressione infettiva (Martelli et al., 2013; Leman et al., 1992). Pertanto, la diagnosi gioca un ruolo chiave, poiché le lesioni macroscopiche e microscopiche riflettono le interazioni tra animale, ambiente e patogeni (Sarli et al., 2021; Marcato, 2002).

### *Fattori di protezione e mitigazione*

Dall'EKE è emerso che il sistema "tutto pieno - tutto vuoto" e i suini provenienti da un singolo fornitore rappresentano i principali fattori di mitigazione del rischio per la PRDC. Queste procedure, associate all'applicazione di un vuoto sanitario di almeno 7 giorni, possono interrompere la catena di trasmissione orizzontale degli agenti eziologici. Il mantenimento della termoneutralità e di una qualità dell'aria ottimale ( $\text{NH}_3 < 10$  ppm) riducono lo stress biologico, specialmente nel periodo post-svezzamento (Campbell et al., 2013). Infine, il basso rischio attribuito allo stato vaccinale per la Malattia di Aujeszky conferma l'efficacia dei protocolli standardizzati e della profilassi immunitaria nel controllo delle principali malattie infettive del suino (Poli et al., 2005; Martelli et al., 2013).

### *Implicazioni per la gestione del rischio*

I risultati di questo studio confermano che il minor rischio è associato alla combinazione di biosicurezza strutturale (fornitore unico, tutto pieno - tutto vuoto), igiene rigorosa (vuoto sanitario adeguato) e corretto monitoraggio ambientale. Al contrario, la carenza di informazioni sanitarie (es. stato PRRS ignoto) ed il degrado dei parametri microclimatici

possono agire sinergicamente causando un elevato incremento del rischio. La presenza di tali fattori richiede interventi correttivi immediati basati su evidenze diagnostiche e anatomo-patologiche (Marcato, 2002; Sarli et al., 2021).

## CONCLUSIONI

Dall'EKE è emerso generalmente un elevato consenso, con una varianza limitata che si è ridotta tra la prima e la seconda valutazione. Tuttavia, i risultati di questo processo richiedono ulteriori analisi statistiche aggiuntive per identificare eventuali fonti di *bias* nelle valutazioni degli esperti. Per almeno un agente eziologico sono risultati fattore di rischio elevato: flusso continuo, alta densità di stabulazione, gas nocivi oltre le soglie critiche, stato della PRRS positivo o sconosciuto e assenza di vaccinazioni. Pertanto, al fine di prevenire e ridurre l'insorgenza della PRDC in allevamento, la rimozione di tali fattori dovrebbe essere considerata prioritaria. Infine, la possibilità per il veterinario di campo di avere a disposizione un questionario semplice, rapido, mirato e pesato per la PRDC permetterà di affrontare meglio i focolai, guidando i percorsi diagnostici considerando sia i dati clinici che il rischio intrinseco dell'allevamento, determinato da specifici fattori strutturali o gestionali. Tale approccio potrà orientare il percorso diagnostico dal campionamento alla selezione dei test, contribuendo a stabilire una *roadmap* diagnostica appropriata per l'identificazione di tutti i potenziali patogeni.

## 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. Brook RH, Chassin MR, Fink A. et al. (1986). A method for the detailed assessment of the appropriateness of medical technologies. *Int j Technol Assess Health Care*. 2:53-63.
3. Brook RH (1994). Appropriateness: the next frontier. *BMJ* 308:218-9.
4. Bozic KJ, Pierce RG, Herdon JH (2004). Health Care Technology Assessment. Basic principles and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 86:1305-14.
5. Campbell, J.M., Crenshaw, J.D. & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *J Animal Sci Biotechnol* 4, 19.
6. DIRETTIVA 2008/120/CE DEL CONSIGLIO del 18 dicembre 2008 che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini
7. EFSA (European Food Safety Authority) (2014). Guidance on Expert Knowledge Elicitation in Food and Feed Safety Risk Assessment. *EFSA Journal* 12(6):3734. [278 pp.]
8. Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J. (1992). *Diseases of Swine* 7th Edizione. Iowa State University Press
9. Marcato, P. S. (2002). *Patologia sistematica veterinaria*. Edagricole
10. Martelli P e AA.VV. (2013) *Le patologie del maiale*. Point Veterinarie Italie
11. Poli, G., Cocilovo, A., Dall'Ara, P., Martino, P. A., & Ponti, W. (2005). *Microbiologia e immunologia veterinaria*. UTET Scienze Mediche.
12. Ruggeri J, Salogni C, Giovannini S, Vitale N, Boniotti MB, Corradi A, Pozzi P, Pasquali P, Alborali GL. (2020). Association Between Infectious Agents and Lesions in Post-Weaned Piglets and Fattening Heavy Pigs With Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). *Front Vet Sci*. 11;7:636.
13. 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(11):256.

# DINAMICHE EPIDEMIOLOGICHE DEL VIRUS DELLA SINDROME RESPIRATORIA E RIPRODUTTIVA DEL SUINO IN ITALIA: IL CONTRIBUTO DEGLI ALLEVAMENTI DI FILIERA E INDIPENDENTI

## *EPIDEMIOLOGICAL DYNAMICS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME IN ITALY: THE CONTRIBUTION OF INTEGRATED AND NON-INTEGRATED FARMS*

VIO D.<sup>1</sup>, USTULIN M.<sup>1</sup>, TARGHETTA C.<sup>1</sup>, ZANON C.<sup>1</sup>, FERINO L.<sup>1</sup>, FAUSTINI G.<sup>2</sup>, FRANZO G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia e Benessere della Specie Suina, IZSVE, SCT4 Pordenone;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

**Parole chiave:** PRRSV, Filodinamica, Epidemiologia

**Key words:** PRRSV, Phylodynamic, Epidemiology

### **Riassunto**

La gestione della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRS) continua a rappresentare una sfida per l'industria suinicola in ragione dell'elevata variabilità genetica e antigenica, la limitata cross-protezione immunitaria e dell'applicazione di misure di biosicurezza interna ed esterna. In Italia un elevato numero di allevamenti è integrato in sistemi di filiera che gestiscono in maniera controllata i flussi di animali; recenti studi basati su stime biostatistiche attribuiscono agli allevamenti indipendenti un ruolo nell'introduzione di nuove varianti in quelli in filiera. In questo studio sono state analizzate più di 500 sequenze di PRRSV provenienti da allevamenti in filiera e indipendenti del centro-nord Italia attraverso approcci filogenetici, filodinamici e filogeografici. In entrambi i sistemi circolano due clade principali di PRRSV, che vedono una popolazione virale più ampia negli allevamenti fuori filiera. In base al clade, il tasso di migrazione del virus dagli allevamenti indipendenti a quelli in filiera è risultato da 2 a 10 volte superiore rispetto al flusso opposto. Il gruppo degli allevamenti indipendenti si caratterizza per una maggiore velocità di dispersione virale. La collaborazione a livello regionale, la condivisione delle informazioni per il controllo dell'infezione e la riduzione della ricircolazione virale tra i diversi sistemi produttivi risultano fondamentali.

### **Abstract**

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a global challenge due to its high variability and limited cross-protection given the partial effectiveness of immune-based control measures and the critical role of biosecurity. In Italy, the effectiveness of hierarchical organization in separating pig flows has been demonstrated but, through biostatistical estimations, revealed also vulnerabilities related to the role of non-integrated farms in introducing new variants into the integrated system. In the present study we analysed over 500 PRRSV sequences from integrated and non-integrated farms in central-northern Italy using phylogenetic, phylodynamic, and phylogeographic approaches. Two main PRRSV clades were identified circulating in both systems, with non-integrated farms hosting a broader viral population. The migration rate of PRRSV from non-integrated to integrated systems was found to be 2–10 times higher than the reverse, depending on the clade. Non-integrated farms exhibited higher viral dispersal speeds, marked by bursts over time. These findings confirm the critical role of non-integrated farms in

PRRSV epidemiology, posing a risk to integrated systems due to their distinct persistence and spread determinants. Regional collaboration and information sharing to control infection and reduce viral recirculation between different productive systems are recommended.

## INTRODUZIONE

La PRRS è una delle patologie suine più importanti a livello mondiale; è causata da due specie virali, il *Betaarterivirus suid 1* ed il *Betaarterivirus suid 2*, genere *Betaarterivirus*, famiglia *Arteriviridae* responsabili di sindromi cliniche sovrapponibili primariamente caratterizzate da segni respiratori, ridotta produttività, mortalità nelle fasi di svezzamento ed ingrasso e disordini riproduttivi nelle scrofe. Similmente ad altri virus a RNA, entrambi i virus sono caratterizzati da un elevato tasso evolutivo grazie agli alti livelli di mutazione e ricombinazione, che ne determinano la persistenza. Nonostante la PRRS sia oggetto di studio da decenni e siano state definite numerose strategie di controllo, questa sindrome rimane diffusa a livello globale; sono comunemente applicate strategie vaccinali e programmi di acclimatazione (Fier *et al.*, 2024) che permettono di ridurre i segni clinici e la diffusione virale pur non riuscendo a prevenire la circolazione virale (Hu *et al.*, 2023).

L'elevata eterogeneità di questi virus e la limitata cross-protezione tra ceppi, inclusi i vaccinali, espone gli allevamenti al rischio di episodi gravi nel caso di introduzione di varianti divergenti. Le misure di biosicurezza sono pertanto essenziali nel controllo della PRRS. In Italia, l'allevamento suino è, per la maggior parte dei casi, organizzato in strutture produttive multi-sito, afferente a filiere integrate o composto da allevamenti indipendenti. L'organizzazione in strutture multi-sito permette di controllare la circolazione virale e limitare l'introduzione di nuove varianti.

Un'ipotesi basata su simulazioni matematiche suggerisce che allevamenti indipendenti svolgano un ruolo nella persistenza, diffusione e reintroduzione virale nei sistemi integrati.

Lo scopo del lavoro è stato testare e verificare questa ipotesi tramite analisi filogenetica e filogeografica dei ceppi circolanti in allevamenti afferenti a filiere integrate e allevamenti indipendenti.

## MATERIALI E METODI

Le sequenze complete di ORF5 incluse nel presente studio sono derivate dall'attività svolta dal Laboratorio di Patologia e Benessere della Specie Suina dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie tra il 2019 ed il 2024. Ogni sequenza è stata codificata con data, localizzazione e categoria dell'allevamento (filiera/indipendente).

Le sequenze della regione ORF5 sono state allineate a livello aminoacidico (AA) e codificate nuovamente alla sequenza nucleotidica attraverso l'algoritmo MAFFT (Standley K, 2013) implementato in TranslatorX (Abascal *et al.*, 2010). La presenza di mutazioni frameshift, inserzioni, delezioni e codoni stop prematuri è stata verificata e considerata come criterio di esclusione dalle analisi.

Le sequenze ottenute sono state allineate col dataset completo delle sequenze PRRSV-1 ORF5 di Genbank e un albero filogenetico preliminare è stato ricostruito tramite IQ-Tree (Nguyen *et al.*, 2015), selezionando il modello di sostituzione migliore calcolando l'Akaike information criterion (AIC) con lo stesso software. L'affidabilità dei clade dedotti è stata determinata con diecimila replicati ultrafast bootstrap. In base all'albero filogenetico, sono stati definiti dataset dedicati ai diversi scopi.

La maggior parte dei ceppi italiani è stata classificata in due clade indipendenti; pertanto, sono stati creati due dataset distinti, denominati Clade A e Clade B. Sono stati inclusi solo i ceppi per i quali era nota la data di raccolta. L'assenza di ricombinazione nell'ambito dei dataset è stata determinata con RDP4 (Martin *et al.*, 2015) e GARD (Genetic Algorithm for Recombination Detection) (Kosakovsky *et al.*, 2006).

I parametri della popolazione virale, inclusi gli antenati comuni più recenti (tMRCA), il tasso evolutivo e le dinamiche delle dimensioni di popolazione, sono stati ricavati dai due dataset attraverso l'approccio della coalescente seriale, come implementato in BEAST v1.10.4 (Suchard et al., 2018). Il modello di sostituzione è stato scelto in base a criteri d'informazione bayesiani (BIC) calcolati con Jmodeltest (Darriba et al., 2012). Per la stima del tasso evolutivo (l'orologio molecolare), si è preferito un modello "relaxed", permettente una variabilità nel corso del tempo e dei *lineage* virali, rispetto ad un modello fisso in base al calcolo del fattore bayesiano (BF) ottenuto tramite la stima delle probabilità marginali dei modelli utilizzando i metodi stepping stone (SS) e path sampling (PS) (Baele et al., 2012). Le dinamiche nel tempo della popolazione virale sono state redatte con approccio SkyGrid (Hill et al., 2019). Le stime finali sono state ottenute tramite simulazioni Markov chain Monte Carlo (MCMC) della lunghezza di 200 milioni di generazioni, campionando i parametri del modello ogni 20.000 generazioni. I risultati sono stati valutati in Tracer v1.7 (BEAST package) (Rambaut et al., 2018). Le stime sono state riassunte tramite valori mediani e riportando il 95% dell'intervallo di massima densità a posteriori (HPD) dopo l'esclusione del 20% iniziale delle simulazioni, considerato burn-in. La migrazione di ceppi virali fra le categorie stesse (*i.e.* filiera e indipendente) è stata stimata, contestualmente ad altri parametri della popolazione virale (e.g. dimensione effettiva della popolazione virale per tipo di allevamento, tasso evolutivo, ecc) e agli alberi tramite un'analisi bayesiana strutturata coalescente con il MultitypeTree package in BEAST 2.7 (Bouckaert et al., 2019). Brevemente, il modello strutturato coalescente è un modello statistico che descrive la genealogia degli individui campionati in una popolazione strutturata in gruppi separati ma in contatto fra loro. Ogni categoria agisce con un "isola" (deme) con la sua specifica dimensione di popolazione, connessa attraverso eventi migratori ad intervalli costanti nel tempo.

Per valutare il possibile ruolo di altre popolazioni non campionate, è stato applicato lo stesso approccio aggiungendo al modello un deme "fantasma" (ossia una popolazione ipotetica non campionata), valutando e confrontando l'adattamento di ciascuno scenario mediante stima della verosimiglianza marginale attraverso i metodi PS e SS.

Le analisi sono state eseguite indipendentemente su CladeA e CladeB, includendo esclusivamente le sequenze ottenute nel presente studio e quelle, con caratteristiche idonee, utilizzate in precedenti studi (Franzo et al. 2021).

La diffusione spazio-temporale del PRRSV è stata ricostruita mediante un approccio filogeografico continuo basato su inferenza bayesiana al fine di valutare i pattern e la velocità di dispersione virale sul territorio considerato.

È stata inoltre analizzata l'influenza delle caratteristiche ambientali sulla dispersione mediante modelli che stimano quanto l'ambiente possa facilitare o ostacolare il movimento delle linee virali. È stato in seguito valutato l'effetto di 12 variabili ambientali sulla distribuzione geografica e sulla velocità di diffusione virale, confrontando i pattern osservati con scenari randomizzati e stimando il supporto statistico tramite Bayes Factors.

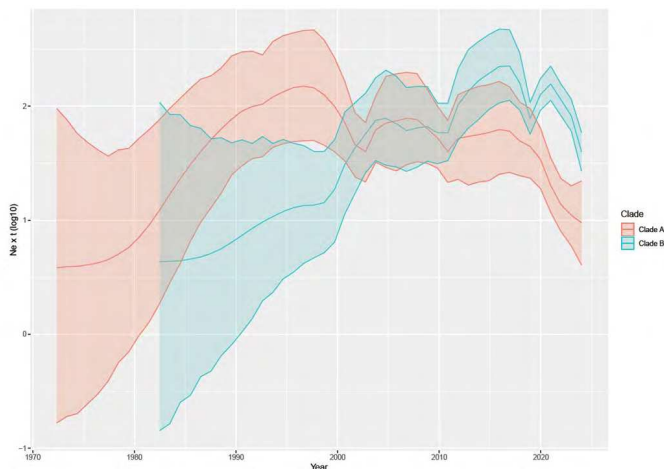
Poiché la distribuzione geografica degli allevamenti nei dataset confrontati risultava solo parzialmente sovrapposta sono stati selezionati esclusivamente gli allevamenti localizzati all'interno di tale area.

## RISULTATI

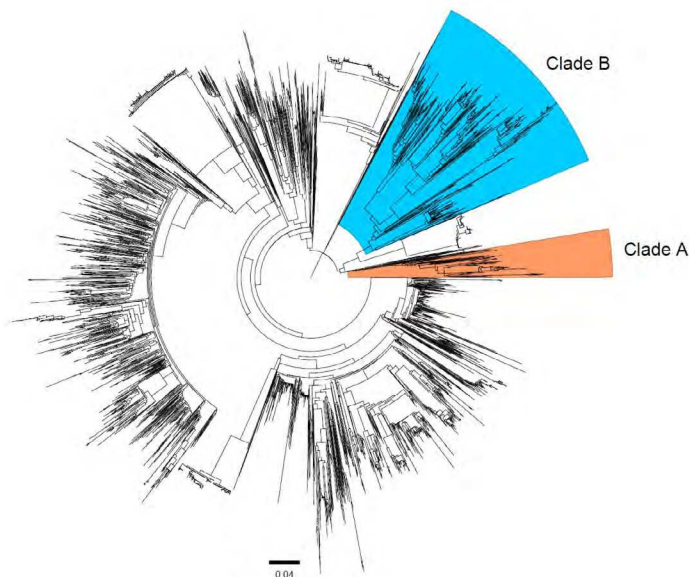
Sono state generate ed incluse nello studio 529 sequenze, 178 da allevamenti parte di filiere 351 da indipendenti. Queste sequenze ricadono in due clade monofiletici del gruppo PRRSV-1 sottotipo 1 (Figura 1) quasi esclusivamente composte di ceppi italiani. Questi due clade possono essere considerati rappresentativi dell'evoluzione della PRRS in Italia.

**Figura 1:** Albero filogenetico di massima verosimiglianza basato sulle sequenze ORF5 analizzate e sequenze internazionali. I clade A e B sono evidenziati.

**Figure 1.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on the ORF5 of the analyzed sequences study plus a set of international reference sequences. Clade A and B are highlighted.



Il “tempo stimato dell’antenato ancestrale comune più recente” (tMRCA) è risultato 1977.98 CE [95% HPD: 1947.75-1986.45] per il CladeA e 1987.69 CE [95% HPD: 1971.56-1995.72] per il CladeB. Entrambi i clade hanno dimostrato tassi evolutivi simili:  $7.22 \times 10^{-3}$  [95% HPD:  $4.48 \times 10^{-3} - 1.05 \times 10^{-2}$ ] per il CladeA e  $1.56 \times 10^{-3}$  [95% HPD:  $1.18 \times 10^{-3} - 1.95 \times 10^{-3}$ ] per il CladeB. In seguito alla loro origine, entrambi i clade hanno co-circolato in Italia sino ad oggi.



**Figura 2:** Ricostruzione delle dinamiche delle dimensioni medie della popolazione virale nei Clade A e B.

**Figure 2.** Skyline plot reporting the mean effective viral population size (Ne x t) of Clade A and B (color-coded).

CladeA ha avuto un graduale aumento dal suo tMRCA fino al 1995, seguito da una stabilizzazione e da un lieve declino, mentre CladeB ha avuto una rapida diffusione, seguita da fasi alterne di aumento e calo negli ultimi anni (Figura 2).

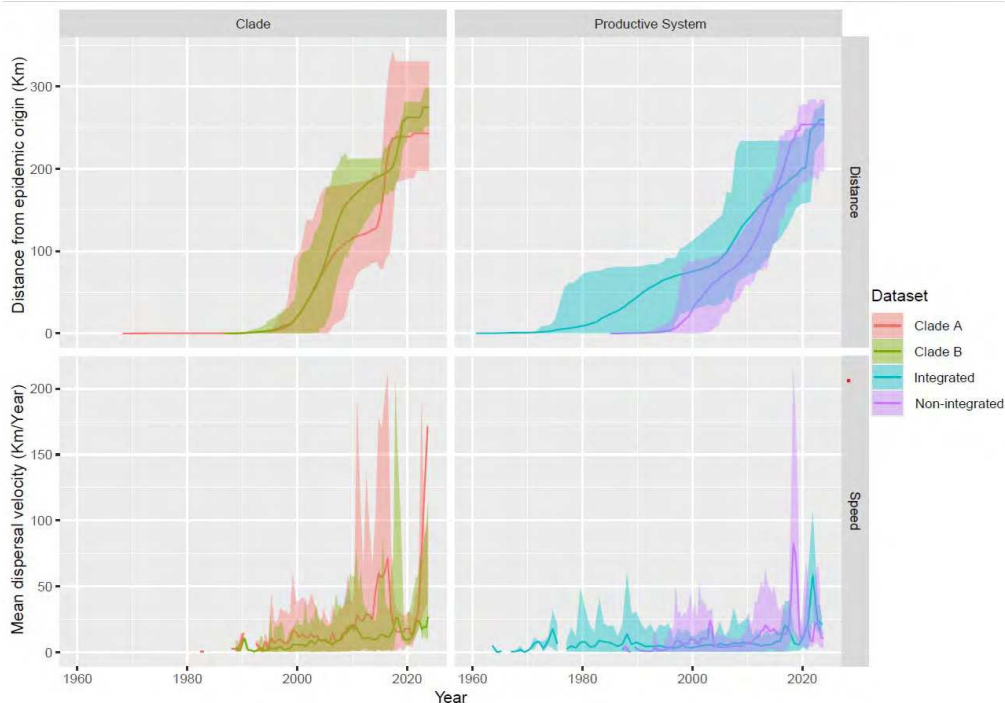
Per entrambi i Clade, gli allevamenti indipendenti hanno svolto un ruolo significativo nel mantenimento della persistenza virale, con la maggior parte delle introduzioni virali dagli allevamenti indipendenti a quelli in filiera. Tuttavia, la presenza di cluster composti principalmente da allevamenti di filiera indicano che, in seguito all'introduzione, i ceppi sono in grado di persistere in tale categoria.

La dimensione effettiva della popolazione virale è stata stimata circa 15 volte superiore nel gruppo di sequenze provenienti da allevamenti indipendenti rispetto a quelli in filiera per il CladeB, mentre solo il doppio nel CladeA. In entrambi i Clade, il tasso di migrazione virale da allevamenti indipendenti a quelli in filiera è stato significativamente maggiore: circa 10 volte maggiore per CladeB, due volte per CladeA.

L'analisi dei pattern di dispersione ha dimostrato una progressiva dispersione centrifuga dalle aree centrali del Nord Italia a quelle più periferiche delle regioni del Nord e Centro Italia. Al fine di evitare l'effetto confondente sulla comparazione da parte di pochi allevamenti con localizzazioni periferiche, questi sono stati esclusi dalla stima delle statistiche di dispersione.

Dopo la loro comparsa, entrambi i Clade hanno dimostrato una dispersione progressiva a velocità comparabili, con il raggiungimento da parte di CladeB di una distribuzione più ampia tra il 2005 ed il 2015 (Figure 3). In seguito, CladeA ha dimostrato un aumento significativo della velocità di dispersione virale, raggiungendo un range geografico comparabile. Confrontando sequenze originate da allevamenti in filiera con quelle provenienti da allevamenti indipendenti, le prime hanno inizialmente mostrato una distribuzione più ampia ed una maggiore propensione alla diffusione. La velocità di dispersione è rimasta essenzialmente costante negli allevamenti di filiera; i dati relativi agli allevamenti indipendenti hanno evidenziato valori medi maggiori e significative oscillazioni nel tempo, con un conseguente aumento nelle aree coinvolte.

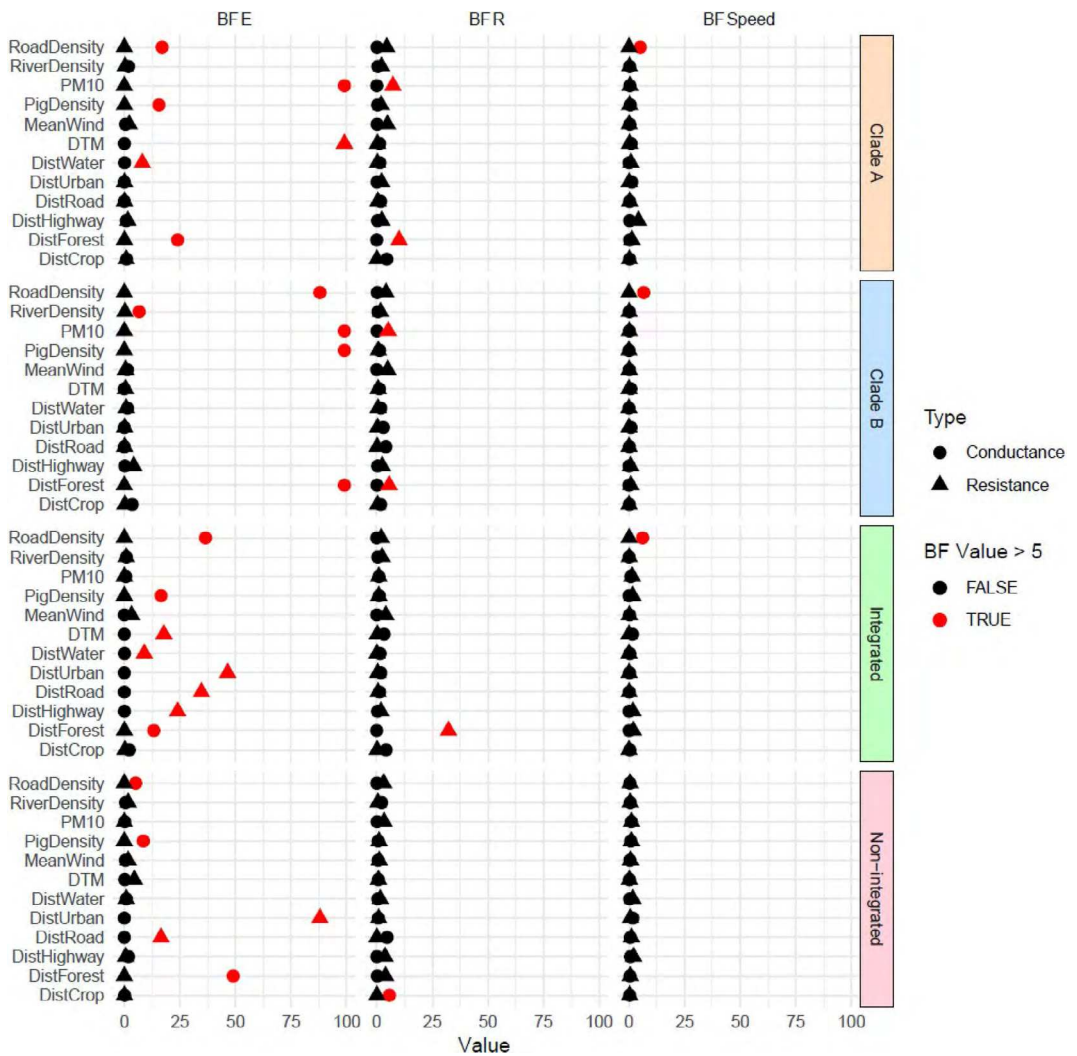
Intorno al 2020 sono stati evidenziati due picchi della velocità di diffusione, dando luogo ad una distribuzione geografica simile delle due popolazioni nel 2024.



**Figura 3:** Velocità e distanze di dispersione media nel tempo dall'origine epidemica di PRRSV.

**Figure 3:** Mean dispersal velocity and distance from the epidemic origin of PRRSV strains over time.

La valutazione di 12 fattori ambientali ha evidenziato una correlazione significativa tra la densità stradale e la velocità di dispersione virale, solo per gli allevamenti in filiera. Per entrambi i sistemi produttivi, i fattori associati positivamente ad una maggiore probabilità di persistenza virale sono risultati la densità di allevamenti, la densità della rete stradale e la distanza dalle zone boschive. Nei dataset di entrambi i sistemi, l'aumento della distanza dalle vie di trasporto (strade, autostrade ed aree urbane) è stato associato ad una minore persistenza virale. L'altitudine è risultata essere un fattore sfavorevole alla persistenza virale nei soli allevamenti di filiera.



**Figura 4.** Sintesi dei valori di BF a supporto dell'effetto dei fattori ambientali considerati sulla persistenza virale (BF E), sull'attrazione (BF R) e sulla velocità di dispersione (BF Speed).

**Figure 4:** Summary of BF values supporting the effect of the considered environmental factors on viral persistence (BF E), attraction (BF R), and dispersal speed (BF Speed).

## DISCUSSIONE

Nonostante gli ingenti sforzi per il controllo, la PRRS rimane una sfida per il settore suinicolo italiano. Il persistere della circolazione dei ceppi di PRRS nel centro-nord Italia e la loro spiccata eterogeneità genetica sono state confermate nel presente studio (Franzo *et al.*, 2015; 2021). L'analisi filogenetica e la ricostruzione delle dinamiche di popolazione hanno dimostrato la presenza di due clade principali co-circolanti in Italia con origini precedenti il primo episodio di PRRS.

I risultati di questo studio confermano ed ampliano i risultati di Franzo *et al.* 2015, dimostrando come il CladeB, introdotto intorno agli anni 80, sia progressivamente aumentato di dimensione attraverso ondate successive di espansione e stabilizzazione fino ai giorni nostri, superando così il preesistente CladeA, che dopo un graduale aumento fino circa al 2000, ha manifestato una tendenza alla stabilizzazione.

Il pattern caratterizzato da fluttuazioni periodiche nella popolazione virale può essere spiegato dalle caratteristiche virali, e dal progressivo sviluppo di immunità clade-specifica nell'ospite o dalla competizione tra clade nella popolazione suina come recentemente evidenziato da Deblanc *et al.*, 2024 suggerendo un ruolo significativo dell'immunità di popolazione nel condizionare la persistenza e la circolazione virale. I picchi di velocità della dispersione virale sono indicativi dell'introduzione di stitipi virali in aree naive.

La persistenza di due clade virali supporta l'ipotesi di una limitata efficacia delle misure di controllo attuate quali la vaccinazione, l'acclimatemento e le misure di biosicurezza.

Nei sistemi di produzione di filiera il trasporto di animali su lunga distanza è presumibilmente responsabile dell'elevata velocità di dispersione; nei sistemi indipendenti, è stata rilevata una velocità di dispersione virale più elevata e caratterizzata da picchi nel tempo, tale andamento suggerisce che questi sistemi siano più esposti all'introduzione del virus e ad episodi di diffusione. Alcune differenze nella gestione aziendale possono rendere gli allevamenti indipendenti più vulnerabili; nonostante i sistemi non integrati in filiera acquistino animali da fonti specifiche e verificate, sono più esposti a carenze nell'approvvigionamento, a fluttuazioni di mercato. Sebbene occasionale, la necessità di acquisto di animali da fonti diverse porta ad un rischio elevato di introduzioni virali su lunga distanza e di conseguenza, ad una dispersione virale più ampia.

La densità della rete stradale si è dimostrata fattore di rischio associato con l'aumento della velocità di dispersione virale sottolineando il ruolo del trasporto nell'aumento del rischio di trasmissione. Il ruolo non statisticamente significativo di questo fattore negli allevamenti non in filiera, può essere spiegato con una maggiore vulnerabilità di questi sistemi ad altre vie di introduzione (*e.g.*, dipendenti, altro personale, fomites, animali, ecc...) riducendo l'impatto statistico della densità stradale.

La densità di allevamenti suinicoli non sembra influenzare la diffusione virale, ma impatta sulla la persistenza locale del virus. La correlazione inversa con la distanza dalle aree urbane, la vicinanza alle zone boschive ed i livelli PM10 (Shang *et al.*, 2020), potrebbe essere attribuibile alla minore densità di allevamenti piuttosto che direttamente alla sopravvivenza del virus.

La correlazione negativa tra l'altitudine e la persistenza del virus della PRRS nei dataset dei ceppi provenienti da filiere riflette probabilmente la tendenza di posizionare in regioni più isolate e spesso collinari o montuose i siti di allevamento dei riproduttori, caratterizzati da standard manageriali e di biosicurezza maggiori; risultati simili, ma non significativi statisticamente, sono stati riscontrati da Arruda *et al.* (2017) negli USA.

La presenza di fiumi, autostrade, zone boschive o la vicinanza a colture non sembrano influenzare l'epidemiologia della PRRS. Tali fattori sono stati inseriti nello studio in quanto correlati alla presenza di selvatici (Lee *et al.*, 2022) e tenuto conto del loro ruolo nell'epidemiologia del circovirus in Italia (Franzo *et al.*, 2023; Faustini *et al.*, 2024), anche se l'importanza dei cinghiali nell'epidemiologia della PRRSV valutata precedentemente da Balint *et al.*, 2024 era stata considerata limitata.

Come evidenziato in questo ed altri lavori, sebbene l'integrazione e l'organizzazione del settore suinicolo di filiera in flussi indipendenti di animali garantisca una migliore protezione nei confronti dell'introduzione di nuovi ceppi, sono state comunque documentate nuove introduzioni (Franzo *et al.*, 2021).

I risultati di questo studio dimostrano che gli allevamenti esterni alle filiere albergano una popolazione virale di PRRSV caratterizzata da una notevole diversità genetica e giocano un ruolo centrale nella diffusione geografica e nell'introduzione del virus in altri allevamenti, inclusi quelli inseriti nell'ambito del sistema delle filiere.

Considerate la marcata variabilità genetica del virus della PRRS e la limitata protezione che l'immunità pregressa, sia naturale, sia vaccinale, può garantire, è improbabile che l'ampliamento delle strategie di controllo a livello di ogni singolo allevamento possa aver successo senza che queste siano integrate in un contesto più ampio. Come evidenziato da altri autori (Magalhaes *et al.*, 2021) il controllo efficace della malattia non può prescindere dalla collaborazione e condivisione, a livello macro-regionale, dei dati tra allevatori, filiere, laboratori e veterinari. In Italia l'attività di sequenziamento di PRRSV è ampiamente applicata ma non in maniera omogenea né su base temporale né geografica e pertanto le principali limitazioni di questo studio sono da attribuirsi a questi fattori. In altre parole è necessario, al fine di raggiungere una elevata attendibilità delle elaborazioni statistiche si rende necessario aumentare per quanto possibile il numero di sequenziamenti per allevamento garantendone la omogeneità nel tempo. Sebbene sia evidente che le stime bioinformatiche riflettano lo scenario reale, come dimostrato in questo lavoro, è analogamente chiaro come sia necessario aumentare in futuro il numero di sequenze, in particolar modo da parte delle aziende indipendenti per meglio comprendere l'epidemiologia della PRRS. L'integrazione di dati relativi a movimentazioni di animali, persone e alimenti nei modelli di migrazione dei virus potrebbe migliorare significativamente la comprensione dei determinanti della diffusione di PRRSV.

## CONCLUSIONI

Il presente studio evidenzia la complessa rete di interazioni che determina l'epidemiologia della PRRS in Italia. In base ai dati di sequenziamento attuali, si conferma l'ipotesi precedente che i sistemi di allevamento suino non integrati giocano un ruolo significativo nel permettere la persistenza e la circolazione virale. La presenza da lunga data di due clade indipendenti e la loro progressiva diffusione, insieme a diversi picchi di aumento della velocità di diffusione del virus, suggeriscono la limitata efficacia delle attuali misure di controllo. Sebbene siano state osservate differenze nella persistenza geografica e nei fattori di rischio di diffusione fra i clade e le categorie di allevamento, la rete della viabilità e la densità di popolazione sono emersi come i due determinanti condivisi e più importanti. Questa evidenza sottolinea l'importanza della condivisione dei dati, di coordinamento degli sforzi e di miglioramento e programmazione a livello macro-regionale per limitare l'impatto della PRRS e favorirne un controllo efficace.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fiers, J., Cay, A. B., Maes, D. & Tignon, M. A Comprehensive Review on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus with Emphasis on Immunity. *Vaccines* 2024, Vol. 12, Page 942 **12**, 942 (2024).
2. Franzo, G. *et al.* Phylodynamic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Italy: Action of selective pressures and interactions between different clades. *Infection, Genetics and Evolution* **31**, 149–157 (2015).
3. Hu, R. *et al.* PRRSV Elimination in a Farrow-to-Finish Pig Herd Using Herd Closure and Rollover Approach. *Viruses* 2023, Vol. 15, Page 1239 **15**, 1239 (2023).
4. Franzo, G. *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome (Prrs) epidemiology in an integrated pig company of northern Italy: A multilevel threat requiring multilevel interventions. *Viruses* **13**, 1–17 (2021).

5. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Legnardi, M., Drigo, M. & Segalés, J. An updated phylogeography and population dynamics of porcine circovirus 2 genotypes: are they reaching an equilibrium? *Front Microbiol* **15**, (2024).
6. Deblanc, C. *et al.* Pathogenicity and escape to pre-existing immunity of a new genotype of swine influenza H1N2 virus that emerged in France in 2020. *Vet Res* **55**, 65 (2024).
7. Magalhães, E. S. *et al.* Next Generation of Voluntary PRRS Virus Regional Control Programs. *Front Vet Sci* **8**, 769312 (2021).
8. Arruda, A. G., Vilalta, C., Perez, A. & Morrison, R. Land altitude, slope, and coverage as risk factors for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) outbreaks in the United States. *PLoS One* **12**, (2017).
9. Shang, B., Liu, Y., Dong, H., Tao, X. & Yao, H. Particulate matter concentrations and emissions of a fattening pig facility in northern China. *Atmos Pollut Res* **11**, 1902–1911 (2020).
10. Lee, S. H. & Park, C. M. The effect of hunter-wild boar interactions and landscape heterogeneity on wild boar population size: A simulation study. *Ecol Modell* **464**, 109847 (2022).
11. Franzo, G. *et al.* Wilder than intense: higher frequency, variability, and viral flows of porcine circovirus 3 in wild boars and rural farms compared to intensive ones in northern Italy. *Front Microbiol* **14**, 1234393 (2023).
12. Faustini, G. *et al.* D for dominant: porcine circovirus 2d (PCV-2d) prevalence over other genotypes in wild boars and higher viral flows from domestic pigs in Italy. *Front Microbiol* **15**, 1412615 (2024).
13. Standley, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.(outlines version 7). *Mol Biol Evol* **30**, 772–780 (2013).
14. Abascal, F., Zardoya, R. & Telford, M. J. TranslatorX: Multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acidNguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* **32**, 268–274 (2015).
15. Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol* **1**, 1–5 (2015).
16. Kosakovsky Pond, S. L., Posada, D., Gravenor, M. B., Woelk, C. H. & Frost, S. D. W. GARD: A genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* **22**, 3096–3098 (2006).
17. Suchard, M. A. *et al.* Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* **4**, (2018).
18. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* vol. 9 772 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109> (2012).
19. Baele, G. *et al.* Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Mol Biol Evol* **29**, 2157–2167 (2012).
20. Hill, V. & Baele, G. Bayesian Estimation of Past Population Dynamics in BEAST 1.10 Using the Skygrid Coalescent Model. *Mol Biol Evol* **36**, 2620–2628 (2019).
21. Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* **67**, 901–904 (2018).
22. De Maio, N., Wu, C. H., O’Reilly, K. M. & Wilson, D. New Routes to Phylogeography: A Bayesian Structured Coalescent Approximation. *PLoS Genet* **11**, e1005421 (2015).
23. Bouckaert, R. *et al.* BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol* **15**, e1006650 (2019).

# FATTORI GESTIONALI ASSOCIATI ALLE PERDITE E AL CONSUMO DI ANTIBIOTICI IN SVEZZAMENTO: STUDIO PILOTA SU 34 ALLEVAMENTI

## *MANAGERIAL FACTORS ASSOCIATED WITH LOSSES AND ANTIBIOTIC USE IN THE WEANING PHASE: A PILOT STUDY IN 34 FARMS*

GIACOMINI E.<sup>1</sup>, MASSERDOTTI M.<sup>2</sup>, GAFFURI M.<sup>1</sup>, DONNESCHI A.<sup>1</sup>, SALVINI F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Medico Veterinario Libero professionista – TEAMVET;*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
"Bruno Ubertini"*

**Parole chiave:** Svezzamento; Consumo di antibiotico; Gestione in bande

**Key Words:** Weaning; Antibiotic use; Batch management system

### **Riassunto**

In un contesto di crescente attenzione alla riduzione dell'uso degli antibiotici e al miglioramento della sostenibilità produttiva, il presente studio pilota ha analizzato i dati di 34 aziende assistite da TeamVet in Pianura Padana, con l'obiettivo di valutare i fattori associati alle perdite e al consumo di antibiotici in fase di svezzamento, momento critico della produzione suinicola. Sono stati raccolti i dati del 2025 relativi a mortalità, scarti, perdite complessive, due patologie principali riscontrate nel sito, gestione in bande, vaccinazione verso PRRSV, tipo di allevamento e consistenza aziendale. Le analisi sono state condotte utilizzando modelli lineari generalizzati. Le perdite sono risultate associate principalmente all'indirizzo produttivo, con valori più elevati nei sistemi a sito unico che negli svezzamenti specializzati. Il consumo di antibiotici è risultato influenzato dall'organizzazione in bande, con una marcata riduzione dell'uso di antibiotico nelle aziende con bande tri-settimanali. La discussione dei risultati con gli allevatori ha evidenziato il valore della raccolta dati come strumento operativo per orientare le scelte gestionali e sanitarie, sottolineando al contempo la necessità di ampliare il campione e integrare ulteriori variabili esplicative.

### **Abstract**

In a context where increasing attention is being paid to reducing the use of antibiotics and improving production sustainability, this pilot study analyzed data from 34 farms assisted by TeamVet in the Po Valley with the aim of evaluating the factors associated with losses and antibiotic consumption during the weaning phase, a critical stage in pig production. Data for 2025 were collected on mortality, culling, overall losses, two main diseases, batch management system, vaccination against PRRSV, farm type and size. Analyses were conducted using generalised linear models. Losses were mainly associated with farm type, with higher values in single-site systems than in weaning-only systems. Antibiotic consumption was influenced by batch management system, with a marked reduction in antibiotic use in farms with three-weekly batch system. Discussion of the results with farmers highlighted the value of data collection as an operational tool for guiding management and health decisions, while emphasizing the need to expand the sample and integrate additional explanatory variables.

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è intensificata l'attenzione verso la riduzione dell'utilizzo degli antibiotici in allevamento, sia per ragioni normative sia per la crescente sensibilità nei confronti dell'antimicrobico-resistenza (1,2). In questo contesto, comprendere quali fattori influenzino maggiormente il ricorso ai trattamenti antibiotici e le performance aziendali è un elemento chiave per migliorare la sostenibilità sanitaria e produttiva degli allevamenti. La fase di svezzamento riveste un ruolo particolarmente critico, poiché in questo periodo si concentrano le maggiori perdite e il più elevato utilizzo di antibiotici (3–5). Il passaggio dalla sala parto allo svezzamento comporta infatti un profondo stress per il suinetto, legato al cambio di ambiente, al mescolamento dei gruppi e alla transizione alimentare (6,7). Questi fattori stressogeni, coincidenti al periodo di transizione dall'immunità passiva di derivazione materna all'instaurarsi di un'immunità propria, rendono gli animali più suscettibili alle infezioni. In tale contesto le viremie, quali quella da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), tendono a esacerbarsi, favorendo l'insorgenza di infezioni batteriche secondarie e aumentando la necessità di interventi terapeutici antibiotici (8-10). La raccolta sistematica dei dati aziendali costituisce uno strumento essenziale per valutare le performance, identificare trend nel tempo e orientare le scelte gestionali. Sebbene negli ultimi anni la qualità dei dati raccolti negli allevamenti sia migliorata, permane un ampio margine di crescita in termini di standardizzazione, continuità, e utilizzo dei dati a supporto delle decisioni.

Il presente lavoro nasce nell'ambito delle attività di aggiornamento e confronto tecnico svolte da TeamVet con gli allevatori assistiti. L'obiettivo è duplice: da un lato analizzare in modo strutturato le perdite in svezzamento e i fattori associati al consumo di antibiotici, dall'altro mostrare agli allevatori il valore della raccolta dati come strumento operativo per individuare criticità e orientare interventi gestionali e sanitari più efficaci.

## MATERIALI E METODI

Lo studio ha coinvolto 34 aziende assistite da TeamVet in Pianura Padana per un totale di circa 107.000 posti in svezzamento, suddivise in Siti 2 (n=18), Siti 1+2 (n=3), Siti 2+3 (n=6) e Siti 1+2+3 (n=7). Per ciascuna azienda sono stati raccolti i dati del 2025 relativi a: mortalità in svezzamento (%), scarti in svezzamento (%), perdite complessive (mortalità + scarti), due principali patologie diagnosticate, e consumo di antibiotici espresso in DDD limitatamente ai siti 2. Sono stati inoltre considerati stato vaccinale verso PRRSV, organizzazione in bande mono-, tri- o penta-settimanali e consistenza aziendale.

Oltre all'analisi descrittiva dei dati aziendali, è stata condotta un'analisi statistica finalizzata a identificare quali variabili aziendali influenzassero maggiormente (1) le perdite in svezzamento, e (2) il consumo di antibiotici, quest'ultimo valutato solo nei Siti 2 puri, unici a disporre di dati affidabili sul consumo di antibiotici. Le variabili esplicative considerate nei modelli sono state indirizzo produttivo dell'azienda, consistenza dello svezzamento, organizzazione in bande e stato vaccinale verso PRRSV.

Le analisi sono state condotte in R versione 4.5.2 utilizzando modelli lineari generalizzati (pacchetto *glmmTMB*). Il consumo di antibiotici in svezzamento è stato analizzato mediante regressione Gamma con link logaritmico, appropriata per variabili continue positive e asimmetriche. Le perdite in svezzamento, espresse come proporzioni comprese tra 0 e 1, sono state analizzate mediante regressione Beta con link logit. La significatività dei fattori è stata valutata tramite test di Wald di tipo II. Il livello di significatività è stato fissato a  $p < 0.05$ .

La raccolta dati è stata effettuata con il coinvolgimento diretto degli allevatori, che hanno condiviso registri aziendali e informazioni gestionali. I risultati sono stati discussi in

incontri dedicati per favorire un'interpretazione condivisa e il confronto tra aziende, e dimostrare l'importanza della raccolta dati per orientare le scelte aziendali.

## RISULTATI

Le perdite in svezzamento hanno mostrato un'elevata variabilità tra i diversi modelli produttivi, con valori minimi compresi tra il 2.5% e il 3.7% e massimi tra il 17.4% e il 35.8%, a seconda dell'indirizzo aziendale (Tabella 1). Le principali patologie riscontrate sono risultate PRRSV, *Streptococcus suis*, *Brachyspira* spp. e *Salmonella* spp., con differenze in base all'indirizzo produttivo dell'azienda (Tabella 1).

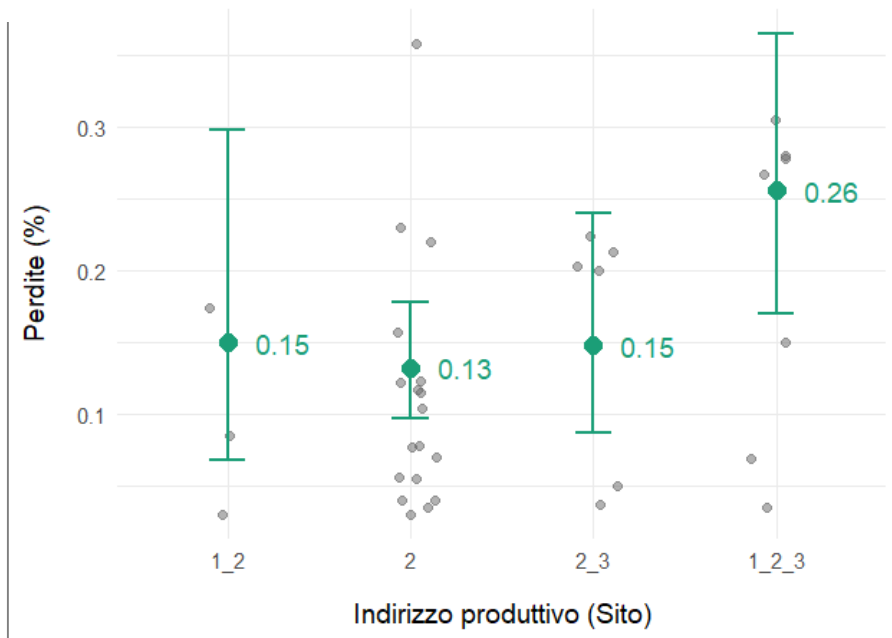
**Tabella 1. Perdite in svezzamento nei diversi sistemi aziendali: statistiche descrittive e patologie principali.** Valori medi (e range minimo – massimo) delle perdite complessive in svezzamento, variabile risposta nelle analisi statistiche, con disaggregazione in mortalità e scarti riportata per completezza informativa. Per ciascuna tipologia aziendale sono riportate anche le due principali patologie riscontrate. I dati relativi ai Siti 1+2 (n = 3, in grigio), vanno interpretati con cautela per l'esiguità campionaria.

**Table 1. Weaning losses in different farm systems: descriptive statistics and main pathologies.** Mean values (and minimum – maximum range) of total weaning losses, response variable in statistical analyses, with breakdown into mortality and culling reported for informative completeness. The two most common diseases found in each farm type are also reported. Data for Sites 1+2 (n = 3, in grey) should be interpreted with caution due to

	Perdite in svezzamento (morti + scarti) (%)	Mortalità in svezzamento (%)	Scarti in svezzamento (%)	Patologie principali
Siti 2	11.3% (3.0% - 35.8%)	7.7% (2.0% - 25.8%)	3.8% (0.05% - 10.0%)	<i>Streptococcus suis</i> ; PRRSV
Siti 1 + 2	9.6% (3.0% - 17.4%)	7.7% (2.0% - 14.7%)	1.9% (1.0% - 2.7%)	PRRSV
Siti 2 + 3	16.9% (3.7% - 22.4%)	5.1% (4.0% - 18.8%)	5.0% (1.0% - 12.7%)	PRRSV; <i>Brachyspira</i> spp.
Siti 1 + 2 + 3	22.5% (3.5% - 30.5%)	17.7% (2.8% - 23.9%)	5.6% (0.6% - 10.0%)	PRRSV; <i>Salmonella</i> spp.

small sample size.

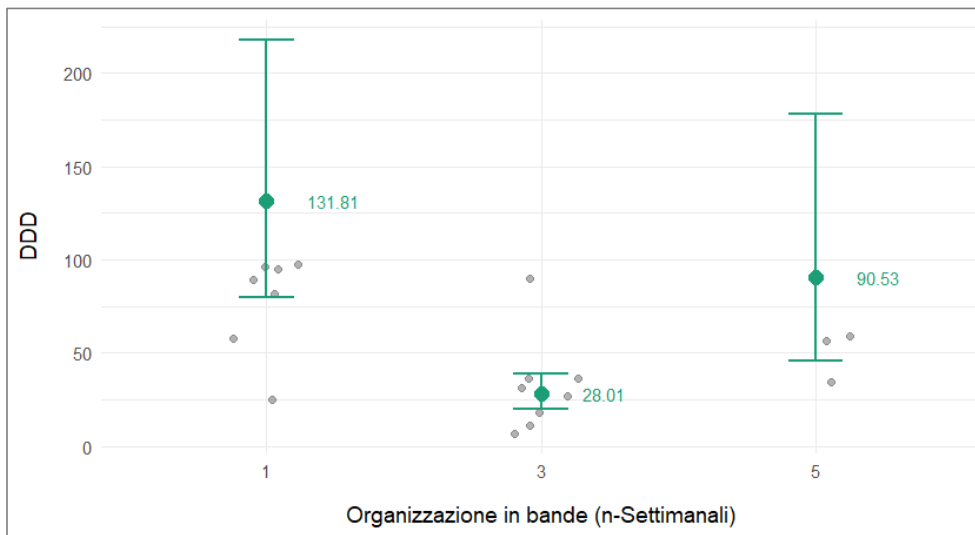
Relativamente alle perdite in svezzamento, l'analisi è stata condotta su tutte le aziende coinvolte nello studio. La gestione a bande era distribuita tra mono- (n = 14), tri- (n = 17) e penta-settimanale (n = 3). Nove aziende vaccinavano contro PRRSV. L'analisi di devianza ha mostrato che l'unica variabile significativa è l'indirizzo produttivo (p = 0.046) (**Figura 1**). La consistenza aziendale ha mostrato una tendenza all'associazione con le perdite. Un'analisi più approfondita dei diversi indirizzi produttivi tramite confronti post-hoc (correzione di Tukey) ha rivelato che la principale differenza risiede nel confronto tra i sistemi a ciclo completo (Sito 1+2+3) e i Siti 2 specializzati. Le aziende a ciclo completo hanno mostrato una probabilità di perdite significativamente superiore rispetto ai Siti 2 (p = 0.027), con un Odds Ratio di 2.25. Non sono state invece riscontrate differenze statisticamente rilevanti tra i Siti 2 e i Siti 2+3 (p = 0.977), i quali presentano profili di rischio sovrapponibili. La categoria Sito 1+2, pur mostrando valori lievemente inferiori, non è risultata significativamente diversa dagli altri indirizzi, verosimilmente per la limitata numerosità campionaria. Infine, mentre l'organizzazione in bande e lo stato vaccinale non sono risultati significativi, si è osservata una tendenza, seppur non significativa (p = 0.078), all'aumento delle perdite con l'aumentare della consistenza aziendale.



**Figura 1.** Percentuale di perdite in svezzamento suddivisa per indirizzo produttivo (Sito). I punti grigi rappresentano le singole unità aziendali, i punti verdi indicano le medie marginali stimate dal modello per ciascun gruppo. Le barre verticali rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% delle stime. Si noti che i dati relativi ai Siti 1+2 sono riportati per completezza espositiva nonostante l'esiguità numerica del campione per questa categoria (n = 3).

**Figure 1.** Percentage of losses during weaning broken down by production type (Site). Gray dots represent individual farms, green dots indicate the model-estimated marginal means for each group. Vertical bars represent 95% confidence intervals of the estimates. Please note that the data for Sites 1+2 are included for the sake of completeness, despite the small sample size for this category (n = 3).

Relativamente al consumo di antibiotici, l'analisi è stata condotta sulle 18 aziende classificate come soli Siti 2. In queste aziende la consistenza media era di circa 3100 posti. La gestione a bande era distribuita tra mono- (n = 7), tri- (n = 8) e penta-settimanale (n = 3); quattro aziende vaccinavano contro PRRSV. Il modello Gamma ha evidenziato un effetto significativo dell'organizzazione in bande e dello stato vaccinale verso PRRSV. La consistenza aziendale ha mostrato una tendenza alla significatività, pur non raggiungendo la soglia statistica convenzionale. Specificamente, la gestione a bande tri-settimanali è risultata essere il fattore più fortemente associato ad una diminuzione dell'uso di antibiotico ( $p < 0.0001$ ) rispetto agli altri sistemi gestionali (**Figura 2**). Al contrario, la vaccinazione verso PRRSV ( $p = 0.048$ ) è risultata associata ad un incremento dell'uso di antibiotici. Infine, i risultati suggeriscono che all'aumentare del numero di capi corrisponda una lieve riduzione dell'uso di antibiotico, sebbene il risultato non sia statisticamente solido ( $p = 0.057$ ).



**Figura 2.** Distribuzione del consumo di antibiotico (DDD) in relazione al sistema di organizzazione in bande (n-settimanali). I punti grigi rappresentano i valori delle singole aziende monitorate, i punti verdi indicano le medie marginali stimate dal modello per ciascun gruppo gestionale (bande mono-, tri- e penta-settimanali). Le barre verticali rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% delle stime.

**Figure 2.** Distribution of antibiotic consumption (DDD) in relation to the batch management system (n-weekly). Gray dots represent the values of the individual farms monitored, green dots indicate the model-estimated marginal means for each batch management group (mono-, tri-, and penta-weekly). Vertical bars represent 95% confidence intervals of the estimates.

Nel complesso, mentre la variabilità delle perdite risulta prevalentemente legata all'indirizzo produttivo dell'azienda, l'uso di antibiotici appare influenzato dall'organizzazione in bande.

## DISCUSSIONE

I risultati dello studio confermano l'elevata variabilità delle performance in svezzamento tra le diverse tipologie aziendali, evidenziando come i fattori gestionali influiscano sulle perdite e sul consumo di antibiotici.

L'indirizzo produttivo è risultato il principale determinante delle perdite in svezzamento. In particolare, le aziende a ciclo completo (Siti 1+2+3) hanno mostrato una possibilità di perdite significativamente superiori rispetto ai Siti 2 specializzati (OR=2.25), mentre i Siti 2+3 non si sono differenziati in modo statisticamente rilevante dai siti 2. Questo dato è coerente con la riduzione della pressione infettiva legata alla separazione degli animali per fase produttiva, tipica dei sistemi multi-sito (11).

Per quanto riguarda il consumo di antibiotici, l'analisi condotta ha evidenziato il ruolo primario dell'organizzazione in bande. Le aziende con gestione a bande tri-settimanali hanno mostrato un significativo decremento della DDD rispetto ai sistemi mono-settimanali, confermando i benefici della separazione dei gruppi di animali nella diminuzione della trasmissione di patogeni e, conseguentemente, della necessità di ricorso agli antibiotici. Analogamente, anche i sistemi penta-settimanali hanno mostrato una riduzione del consumo di antibiotici rispetto alla gestione settimanale, sebbene in misura meno marcata rispetto ai sistemi tri-settimanali.

Questi dati sono coerenti con la letteratura sui benefici dei sistemi in bande plurisettimanali (12–14) grazie al minor numero di movimentazioni, alla maggiore uniformità dei suinetti e alla miglior applicazione di un sistema tutto pieno – tutto vuoto.

Anche la maggiore consistenza aziendale ha mostrato una tendenza, pur non significativa, ad un minor consumo di antibiotico. Ciò trova conferma in letteratura, ed è probabilmente legato a standard inferiori di biosicurezza e gestione negli allevamenti più piccoli (15).

La relazione tra stato vaccinale verso PRRSV e consumo di antibiotici richiede particolare cautela interpretativa. Le aziende che vaccinano hanno mostrato una DDD più elevata, che riflette verosimilmente un effetto di casualità inversa: sono maggiormente inclini a ricorrere alla vaccinazione aziende che sperimentano focolai ricorrenti (16), dove l'azione immunosoppressiva del PRRSV (17,18) porta al potenziamento dell'azione di altri patogeni virali e batterici (21,22), aumentando la necessità di ricorrere a trattamenti antibiotici.

Un elemento di interesse riguarda l'apparente dissociazione tra i fattori che influenzano il consumo di antibiotici e quelli che determinano le perdite in svezzamento. Mentre l'organizzazione in bande risulta il principale modulatore del consumo di antibiotico, essa non si traduce in una riduzione statisticamente significativa delle perdite complessive. Analogamente, l'indirizzo produttivo è risultato associato in modo significativo alle perdite in svezzamento, ma non al consumo di antibiotico. Approfondire questa relazione con campioni più ampi potrebbe fornire indicazioni preziose sull'efficacia degli interventi gestionali.

Il presente lavoro rappresenta uno studio pilota: la robustezza dei modelli gioverebbe dell'inclusione di più allevamenti, soprattutto appartenenti a categorie meno rappresentate quali i Siti 1+2, e dell'inclusione di variabili non disponibili in questo dataset ma potenzialmente rilevanti, quali modalità di rimonta (interna vs esterna), genetica, distanza da altri allevamenti e densità zootecnica circostante, livello di biosicurezza e di benessere animale (21).

Infine, un elemento centrale emerso dal lavoro è il valore della raccolta dati come strumento gestionale. Il confronto con gli allevatori ha evidenziato come la registrazione dei dati permetta non solo di monitorare l'andamento aziendale, ma anche di identificare criticità, valutare l'efficacia degli interventi e orientare decisioni più consapevoli. Esiste ancora un significativo margine di crescita, soprattutto nella sistematicità e nella capacità di utilizzare i dati come supporto operativo.

## CONCLUSIONI

L'analisi condotta ha evidenziato come perdite e consumo di antibiotici in svezzamento siano influenzati da fattori gestionali. In particolare, la gestione in bande tri-settimanali ha mostrato una significativa riduzione dell'uso dell'antibiotico rispetto alle bande settimanali, mentre le perdite sono risultate influenzate dall'organizzazione aziendale, dove i Siti 2 specializzati nella fase di svezzamento hanno registrato perdite significativamente inferiori rispetto ai siti unici dove si realizza l'intero ciclo produttivo (Sito 1+2+3).

La complessità delle interazioni tra fattori sanitari e gestionali richiede un approccio integrato, che deve essere supportato da una raccolta dati accurata e condivisa tra veterinari e allevatori.

## BIBLIOGRAFIA

1. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). European Commission; 2017.
2. Farm to fork strategy: for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. European Commission; 2020.
3. Sjölund M, Postma M, Collineau L, Lösken S, Backhans A, Belloc C, et al. Quantitative and qualitative antimicrobial usage patterns in farrow-to-finish pig herds in Belgium,

- France, Germany and Sweden. *Prev Vet Med.* 1 agosto 2016;130:41–50. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.06.003
4. Echtermann T, Müntener C, Sidler X, Kümmerlen D. Antimicrobial Drug Consumption on Swiss Pig Farms: A Comparison of Swiss and European Defined Daily and Course Doses in the Field. *Front Vet Sci.* 18 luglio 2019;6. doi:10.3389/fvets.2019.00240
  5. Sarrazin S, Joosten P, Van Gompel L, Luiken REC, Mevius DJ, Wagenaar JA, et al. Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage patterns in 180 selected farrow-to-finish pig farms from nine European countries based on single batch and purchase data. *J Antimicrob Chemother.* 1 marzo 2019;74(3):807–16. doi:10.1093/jac/dky503
  6. Albernaz-Gonçalves R, Olmos Antillón G, Hötzel MJ. Linking Animal Welfare and Antibiotic Use in Pig Farming—A Review. *Animals.* 17 gennaio 2022;12(2):216. doi:10.3390/ani12020216
  7. Martínez-Miró S, Tecles F, Ramón M, Escribano D, Hernández F, Madrid J, et al. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet Res.* dicembre 2016;12(1):171. doi:10.1186/s12917-016-0791-8
  8. Zhao D, Yang B, Yuan X, Shen C, Zhang D, Shi X, et al. Advanced Research in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Co-infection With Other Pathogens in Swine. *Front Vet Sci.* 26 agosto 2021;8. doi:10.3389/fvets.2021.699561
  9. Franzo G, Barbierato G, Pesente P, Legnardi M, Tucciarone CM, Sandri G, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Epidemiology in an Integrated Pig Company of Northern Italy: A Multilevel Threat Requiring Multilevel Interventions. *Viruses.* 14 dicembre 2021;13(12):2510. doi:10.3390/v13122510 PubMed PMID: 34960778; PubMed Central PMCID: PMC8705972.
  10. Teixeira Costa C, Lebre A, Bougeard S, Rose N. PRRS management by European swine veterinarians: a descriptive insight into practices and profiles. *Porc Health Manag.* 5 novembre 2025;11:55. doi:10.1186/s40813-025-00467-0 PubMed PMID: 41194186; PubMed Central PMCID: PMC12587695.
  11. Harris DL. *Multi-Site Pig Production.* John Wiley & Sons; 2008. 235 p.
  12. Mekerke B, Leneveu P. Modifications de conduite de bandes et impact sur la situation sanitaire: analyse de quelques exemples. In: Toulouse, France; 2006. p. 49–64.
  13. Bown P. Advantages and disadvantages of batch farrowing. In *Pract.* 2006;28(2):94–6. doi:10.1136/inpract.28.2.94
  14. Vangroenweghe F, Suls L, Van Driessche E, Maes D, De Graef E. Health advantages of transition to batch management system in farrow-to-finish pig herds. *Veterinární Medicína.* 29 febbraio 2012;57(2):83–91. doi:10.17221/5254-VETMED
  15. Scali F, Santucci G, Maisano AM, Giudici F, Guadagno F, Tonni M, et al. The Use of Antimicrobials in Italian Heavy Pig Fattening Farms. *Antibiotics.* 10 dicembre 2020;9(12):892. doi:10.3390/antibiotics9120892 PubMed PMID: 33322049; PubMed Central PMCID: PMC7764202.
  16. Mallioris P, Luiken REC, Tobias T, Vonk J, Wagenaar JA, Stegeman A, et al. Risk factors for antimicrobial use in Dutch pig farms: A cross-sectional study. *Res Vet Sci.* 1 luglio 2024;174:105307. doi:10.1016/j.rvsc.2024.105307
  17. Drew TW. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res.* 2000;31(1):27–39. doi:10.1051/vetres:2000106 PubMed PMID: 10726636.
  18. Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016;4:129–54. doi:10.1146/annurev-animal-022114-111025 PubMed PMID: 26646630.

19. Feng W, Laster SM, Tompkins M, Brown T, Xu JS, Altier C, et al. In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol.* maggio 2001;75(10):4889–95. doi:10.1128/JVI.75.10.4889-4895.2001 PubMed PMID: 11312360; PubMed Central PMCID: PMC114243.
20. Shibata I, Yazawa S, Ono M, Okuda Y. Experimental dual infection of specific pathogen-free pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* febbraio 2003;50(1):14–9. doi:10.1046/j.1439-0450.2003.00605.x PubMed PMID: 12710495; PubMed Central PMCID: PMC7165977.
21. Diana A, Lorenzi V, Penasa M, Magni E, Alborali GL, Bertocchi L, et al. Effect of welfare standards and biosecurity practices on antimicrobial use in beef cattle. *Sci Rep.* 1 dicembre 2020;10:20939. doi:10.1038/s41598-020-77838-w PubMed PMID: 33262402; PubMed Central PMCID: PMC7708642.

# DINAMICHE EPIDEMIOLOGICHE E RESISTENZA ANTIMICROBICA EMERGENTE IN STREPTOCOCCUS SUIIS NEGLI ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD ITALIA (2021-2025)

## EPIDEMIOLOGICAL DYNAMICS AND EMERGING ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN STREPTOCOCCUS SUIIS IN SWINE HERDS OF NORTHERN ITALY (2021–2025)

DILIO G.<sup>1</sup>; PEPE F.<sup>1</sup>; CUCCO L.<sup>2</sup>; CORNAGGIA M.<sup>1</sup>; GAZZOLA A.<sup>1</sup>; ALBINI E.<sup>2</sup>;  
MASSACCI F. R.<sup>2</sup>; SALA L.<sup>1</sup>; VENTURA S.<sup>1</sup>; MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna «B. Ubertini», Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia (BS);

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati",  
Via G. Salvemini 1 - 06126 Perugia (PG);

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*; suino; antibiotico-resistenza

**Key words:** *Streptococcus suis*; pig; antibiotic-resistance

### Riassunto

*Streptococcus suis* è un patogeno di rilevanza veterinaria e zoonotica, responsabile di gravi patologie nel suino e di infezioni nell'uomo. La streptococcosi è endemica negli allevamenti suini e comprende 29 sierotipi con diversa patogenicità; il controllo si basa principalmente su terapia antibiotica, in particolare  $\beta$ -lattamici, e vaccini sierotipo-specifici. In questo studio sono stati analizzati 293 ceppi non ridondanti di *S. suis* isolati da casi clinici nel suino conferiti all'IZSLER di Lodi da allevamenti del Nord Italia (2021–2025), valutandone sierotipo, profilo di virulenza e resistenza agli antimicrobici mediante il test di minima concentrazione inibente (MIC). I ceppi sono stati caratterizzati mediante multiplex PCR per sierotipo (1, 2, 7, 9 o non determinato, ND) e marker di virulenza (MRP, SLY, EPF). Un sottogruppo (n = 24) è stato sottoposto a sequenziamento dell'intero genoma. I risultati mostrano una predominanza dei sierotipi 9 (29,3%) e 2 (26,5%) e un'elevata percentuale di isolati ND (33,5%). L'analisi longitudinale ha evidenziato un incremento progressivo delle MIC per  $\beta$ -lattamici e aminoglicosidi. La resistenza ai  $\beta$ -lattamici risulta associata ai sierotipi 9 e ND, mentre la resistenza agli aminoglicosidi non è sierotipo-dipendente. L'analisi genomica ha evidenziato la circolazione di *novel capsular types* e la presenza di geni che codificano per *aminoglycoside-modifying enzymes* (AME), confermando la natura evolutiva dinamica della popolazione di *S. suis*.

### Abstract

*Streptococcus suis* is a pathogen of major veterinary and zoonotic relevance, causing severe disease in pigs and infections in humans. Streptococcosis is endemic in swine herds and includes 29 serotypes with variable pathogenic potential; control mainly relies on antimicrobial therapy, particularly  $\beta$ -lactams, and serotype-specific vaccines. This study analyzed 293 non-redundant *S. suis* isolates from clinical cases in pigs submitted to the IZSLER laboratory in Lodi from farms in Northern Italy (2021–2025), evaluating serotype distribution, virulence profiles, and antimicrobial resistance using the minimal inhibitory concentration (MIC) test. Isolates were characterized by multiplex PCR for serotyping (1, 2, 7, 9, or non-determined, ND) and virulence markers (MRP, SLY, EPF). A subset (n = 24) was

analyzed by whole genome sequencing. Serotypes 9 (29.3%) and 2 (26.5%) predominated, with a high proportion of ND isolates (33.5%). Longitudinal analysis showed a progressive increase in MICs for  $\beta$ -lactams and aminoglycosides. Resistance to  $\beta$ -lactams was associated with serotypes 9 and ND, whereas aminoglycoside resistance was not serotype-dependent. Genomic analysis revealed novel capsular types and aminoglycoside-modifying enzyme (AME) genes in resistant isolates, highlighting the dynamic evolutionary nature of the *S. suis* population.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* rappresenta uno dei principali patogeni batterici del comparto suinicolo, responsabile di forme cliniche invasive quali meningite, artrite, setticemia ed endocardite, con un impatto sanitario ed economico rilevante negli allevamenti intensivi. È inoltre riconosciuto come patogeno zoonotico, rappresentando un rischio per la salute pubblica, soprattutto, per soggetti professionalmente esposti (Dutkiewicz et al., 2017; Gottschalk et al., 2010).

La streptococcosi suina è endemica nelle aree ad alta densità produttiva, dove *S. suis* colonizza frequentemente le tonsille e le prime vie respiratorie di animali clinicamente sani, favorendo una circolazione persistente del patogeno negli allevamenti. Fattori gestionali e ambientali, quali stress da svezzamento, rimescolamento dei gruppi e co-infezioni, possono facilitare la transizione da colonizzazione a malattia clinica (Segura et al., 2020).

Sono riconosciuti 29 sierotipi, caratterizzati da diversa distribuzione geografica e capacità patogena (Králová et al., 2024; Zhu et al., 2024). In Europa, e in particolare nel Nord Italia, i sierotipi 2 e 9 risultano tra i più frequentemente associati a casi clinici, con una marcata diffusione del sierotipo 9 in specifici contesti produttivi (Cucco et al., 2022; Willemse et al., 2019). La patogenicità di *S. suis* non si deduce esclusivamente dal sierotipo, ma anche dalla presenza di specifici marker di patogenicità, tra cui *muramidase-released protein* (MRP), *suilisina* (SLY) ed *extracellular protein factor* (EPF), la cui combinazione definisce profili associati a un maggiore potenziale invasivo e alla persistenza di lineaggi ad alto rischio negli allevamenti (Fittipaldi et al., 2012).

I vaccini ad oggi disponibili sono costituiti da batterine; questi presidi non sono sempre efficaci e forniscono una protezione limitata al sierotipo di appartenenza (Segura, 2015). Di conseguenza, il controllo della streptococcosi si basa prevalentemente sull'impiego di antimicrobici. I  $\beta$ -lattamici rappresentano storicamente la terapia di prima scelta; tuttavia, numerosi studi hanno documentato segnali di ridotta sensibilità e resistenza emergente, con differenze rilevanti in funzione dell'area geografica, del periodo di isolamento e del sierotipo (Hernandez-Garcia et al., 2017; Massacci et al., 2024; Palmieri et al., 2011). In Italia, l'analisi di isolati clinici raccolti nel periodo 2017–2019 ha evidenziato la presenza di nuovi *Sequence Type* (ST) e di cloni di *S. suis*, in particolare sierotipo 9, associati a profili di resistenza di crescente rilevanza (Cucco et al., 2022). Uno studio su isolati di sierotipo 9 raccolti tra 2002 e 2021 in nove regioni del Nord e Centro Italia ha confermato, mediante approccio genomico, la diffusione di lineaggi ad alto rischio caratterizzati da ridotta sensibilità alla penicillina (Massacci et al., 2024).

Nonostante tali evidenze, i dati disponibili sono prevalentemente di tipo trasversale o descrittivo; risultano invece limitate le analisi retrospettive strutturate che valutino l'evoluzione temporale dei valori di MIC e della probabilità di resistenza ai  $\beta$ -lattamici in *S. suis*. In questo contesto si inserisce il presente studio, che analizza isolati clinici di *S. suis* provenienti da allevamenti suini del Nord Italia nel periodo 2021–2025, integrando sierotipi, profili di virulenza e dati di sensibilità antimicrobica, con l'obiettivo di descrivere le dinamiche evolutive della resistenza agli antibiotici in questa specie.

## MATERIALI E METODI

Lo studio ha incluso 293 ceppi non ridondanti di *S. suis* isolati da casi clinici nel suino e conferiti alla sede territoriale di Lodi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER). Gli isolati sono stati conferiti da allevamenti suini del Nord Italia nell'ambito dell'attività diagnostica routinaria nel periodo 2021–2025. Per ciascun allevamento, è stato incluso un solo isolato per anno.

L'identificazione preliminare dei ceppi come *S. suis* è stata effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche e biochimiche, e confermata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (MALDI Biotyper Sirius, Bruker Daltonics).

La caratterizzazione molecolare dei ceppi è stata eseguita mediante multiplex PCR, per la determinazione del sierotipo capsulare (sierotipi 1, 2, 7 e 9) (Okura et al., 2014); i ceppi negativi per tali sierotipi sono stati classificati come “non determinati” (ND). Contestualmente, sono stati ricercati i principali marker di patogenicità di *S. suis* (MRP, SLY ed EPF), mediante multiplex PCR (King et al., 2001; Silva et al., 2006; Wisselink et al., 1999).

La MIC (Minimum Inhibitory Concentration) è stata valutata mediante microdiluizione in brodo. Sono stati testati 16 antimicrobici di interesse veterinario e umano (pannello customizzato per IZZSS, ITISVE8 Thermofisher), delle principali classi antibiotiche comunemente impiegate nel trattamento delle infezioni sostenute da *S. suis*, con particolare attenzione ai  $\beta$ -lattamici ed agli aminoglicosidi. I valori di MIC sono stati interpretati sulla base degli Epidemiological Cut-Off (ECOFF) riportati in letteratura per *S. suis* (Hernandez-Garcia et al., 2017); in assenza di ECOFF specifici, sono stati adottati valori empirici definiti sulla base degli ECOFF EUCAST disponibili per *S. pneumoniae* (MIC EUCAST, 2026). Per gli antimicrobici privi di ECOFF epidemiologici sono stati utilizzati breakpoint clinici, classificando gli isolati come sensibili (S) o resistenti (R). I valori di riferimento sono stati selezionati secondo una gerarchia di linee guida comprendente CLSI VET08, CLSI M100, EUCAST v.15 e CASFM 2019, in conformità con i protocolli interpretativi degli IZZSS.

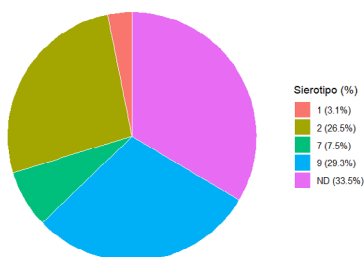
Inoltre, un sottogruppo selezionato di 24 isolati è stato sottoposto a *Whole Genome Sequencing* (WGS). La selezione ha riguardato ceppi setticemici (isolati da cuore, cervello, linfonodo, milza e fegato), non ridondanti, con valori elevati di MIC per la kanamicina (MIC >32  $\mu$ g/ml) e/o ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici. Il DNA genomico dei 24 isolati è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), quindi sequenziato su piattaforma Illumina MiSeq. Le sequenze sono state assemblate usando SPAdes genome assembler v3.11.1 (Prjibelski et al., 2020) e annotate mediante Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014). Le sequenze dei 24 ceppi di *S. suis* sono state utilizzate per identificare il sierotipo capsulare utilizzando BLASTN v2.13.0 (Camacho et al., 2009) per l'allineamento del locus capsulare (*cps*) con i sierotipi di riferimento di *S. suis* precedentemente descritti (Králová et al., 2024), il ST utilizzando *S. suis* MLST database (<https://pubmlst.org/ssuis/>) ed i geni codificanti la resistenza agli antimicrobici, analizzati mediante ABRicate con database CARD (<https://github.com/tseemann/abricate>).

Le distribuzioni dei sierotipi, dei profili di virulenza e delle sedi di isolamento sono state analizzate mediante statistica descrittiva (test del  $\chi^2$  di Pearson); nei casi in cui le frequenze attese risultassero inferiori a 5, è stato applicato il test esatto di Fisher con simulazione Monte Carlo. L'andamento temporale dei valori di MIC, preventivamente trasformati in  $\log_2$ , è stato analizzato utilizzando il test di Jonckheere–Terpstra, un test non parametrico per trend monotoni in gruppi ordinati. Per valutare l'associazione tra le caratteristiche degli

isolati e la probabilità di resistenza ai  $\beta$ -lattamici, è stata condotta un'analisi di regressione logistica binaria. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software R (versione 4.5.0, R Core Team, 2025) tramite l'ambiente di sviluppo RStudio (versione 2025.05.1+513, Posit Software, PBC). È stato adottato un livello di significatività statistica pari a  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

È stata evidenziata una netta predominanza di sierotipo 9 (29,3%) e sierotipo 2 (26,5%), che insieme rappresentano oltre la metà degli isolati analizzati, seguiti dai sierotipi 7 (7,5%) e 1 (3,1%). Una percentuale rilevante di ceppi (33,5%) è risultata di sierotipo ND, suggerendo la possibile circolazione di sierotipi non inclusi nel sistema di tipizzazione o di varianti emergenti.



**Figura 1.** Distribuzione percentuale dei sierotipi.  
**Figure 1.** Percentage distribution of serotypes.



**Figura 2.** Heatmap percentuale dei profili di virulenza vs. sierotipo.  
**Figure 2.** Percentage heatmap of virulence profiles vs. serotype.

L'analisi dei marker di virulenza ha permesso di definire diversi profili di virulenza. È emersa una forte associazione tra sierotipo e virulotipo (Fisher test,  $p=1 \times 10^{-5}$ ). In particolare, il profilo MRP+/SLY+/EPF+ è risultato quasi esclusivo del sierotipo 2, mentre il sierotipo 9 ha mostrato prevalentemente profili MRP+/SLY+/EPF-. I ceppi ND hanno evidenziato una maggiore eterogeneità, includendo sia profili negativi per tutti i marker sia combinazioni variabili, indicativa di una popolazione geneticamente più diversificata.

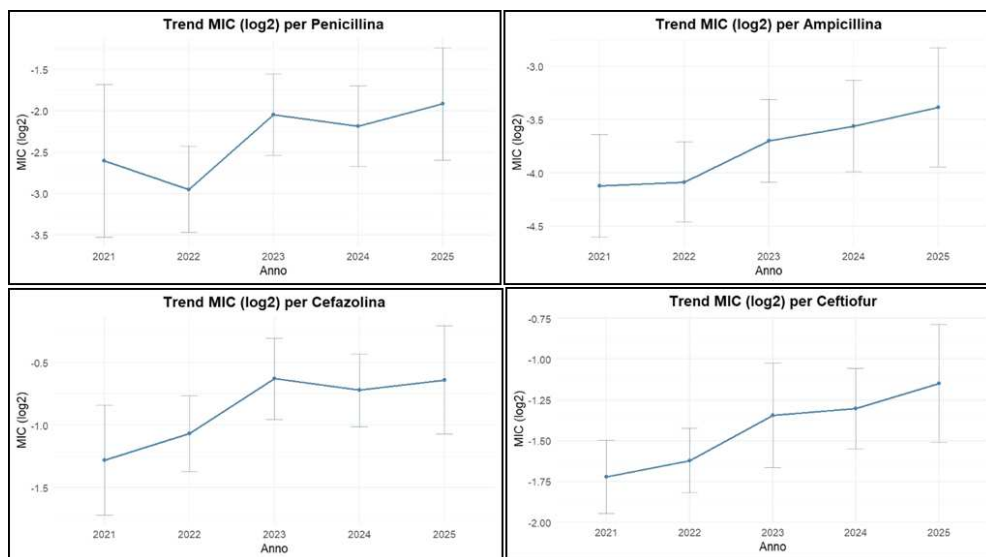
L'analisi descrittiva della distribuzione temporale dei virulotipi negli allevamenti che hanno conferito campioni per più anni consecutivi ha evidenziato la persistenza del profilo MRP+/SLY+/EPF- associato ai sierotipi 2 e 9 in specifiche realtà aziendali nel periodo 2022–2024. Parallelamente, è stata osservata la comparsa di isolati ND a partire dal 2023, con incremento nel biennio 2024–2025 e maggiore eterogeneità dei profili di virulenza.

L'analisi dei valori di MIC ha evidenziato differenze rilevanti tra le diverse classi di antimicrobici (Tabella 1). Per quanto riguarda i  $\beta$ -lattamici, è stato osservato un progressivo incremento dei valori di MIC dal 2021 al 2025, indicativo di una riduzione della sensibilità. In particolare, sono emersi trend temporali in aumento significativi o borderline per penicillina ( $p=0.036$ ), ampicillina ( $p=0.063$ ), cefazolina ( $p=0.062$ ) e ceftiofur ( $p=0.027$ ). Il trend di resistenza per i  $\beta$ -lattamici è in aumento nel 2025, come si evince dalle linee di tendenza in Figura 3. Anche per la kanamicina è stato osservato un trend in aumento significativo ( $p=2 \times 10^{-9}$ ).

ANTIMICROBIC	#	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	128	≥ 250	≥ 500	MIC50	MIC90
Penicillin	293	64	57	19	21	78	27	14	5	3	5					0,25	1
Ampicillin	293	140	60	44	9	21	7	6	3	2	1					0,0625	0,5
Amoxicillin + clavulanic acid	293				257	15	10	3	3	2	3					0,25	0,5
Cefazoline	293				136	38	68	33	12	6						0,5	2
Ceftiofur	293				199	46	29	9	1	9						0,25	1
Oxacillin	293				184	53	36	8	12							0,25	1
Rifampin	293		220	57	9	1	3	3								0,0625	0,125
Florfenicol	293							274	5	14						2	2
Enrofloxacin	293				67	163	55	4	4							0,5	1
Clindamycin	293					34	1	258								2	2
Erythromycin	293	12	33	4	0	1	4	6	5	228						8	8
Tilmicosin	293									50	3	240				32	32
Kanamycin	293									23	34	36		161	39	250	500
Tetracycline	293				3	3	6	8	12	3	258					16	16
Sulfisoxazole	291												30	10	251	≥500	≥500
Trimethoprim + sulfadiazine	291			102	21	9	15	17	46	81						1	8

**Tabella 1.** Distribuzione dei valori MIC tra i 293 isolati di *S. suis*. I margini laterali più spessi indicano i breakpoint clinici (S; R), mentre un singolo margine spesso indica l'ECOFF (WT; non-WT); le celle grigie rappresentano concentrazioni non testate, mentre “#” indica il numero di isolati considerati.

**Table 1.** Distribution of MIC values among 293 *S. suis* isolates. Thick cell borders indicate clinical breakpoints (S; R), whereas a single thick border indicates ECOFF (WT; non-WT). Grey cells represent concentrations not tested, whereas “#” indicates the number of isolates.



**Figura 3.** Linee di tendenza dei quattro β-lattamici oggetto di studio (penicillina, ampicillina, cefazolina, ceftiofur) ottenute per trasformazione logaritmica in log<sub>2</sub> dei valori di MIC (μg/ml) nel periodo 2021-2025.

**Figure 3.** Trend lines of the four β-lactam antibiotics under study (penicillin, ampicillin, cefazolin, and ceftiofur), obtained by logarithmic (log<sub>2</sub>) transformation of MIC values (μg/mL) over the period 2021–2025.

L'analisi mediante regressione logistica ha evidenziato un ruolo rilevante del sierotipo 9 e dei ceppi ND come fattori associati alla resistenza ai  $\beta$ -lattamici, in particolare alla penicillina (S9:  $p < 0,001$ ; ND:  $p = 0,055$ ), alla cefazolina (S9:  $p = 0,002$ ; ND:  $p = 0,007$ ) ed al ceftiofur (ND:  $p = 0,034$ ). Incrementi significativi della probabilità di resistenza sono stati osservati per ampicillina ( $p = 0,0027$ ), per cefazolina negli anni 2023–2024 (2023:  $p = 0,011$ ; 2024:  $p = 0,029$ ) e per ceftiofur nel 2025 ( $p = 0,038$ ). Per quanto riguarda la kanamicina, la regressione logistica ha evidenziato un aumento marcato e progressivo della probabilità di resistenza negli anni 2022–2025 rispetto al 2021 (2022:  $p = 0,004$ ; 2023:  $p = 0,002$ ; 2024–2025:  $p < 0,001$ ), indipendentemente dal sierotipo. Per le altre classi di antimicrobici, la resistenza a macrolidi e tetracicline è risultata sostanzialmente stabile nel periodo considerato.

L'analisi genomica dei 24 isolati sottoposti a WGS ha permesso una caratterizzazione approfondita del locus capsulare, del profilo clonale e dei determinanti genetici di resistenza agli antimicrobici (Tabella 2). Dei 24 ceppi testati mediante multiplex PCR, 12 appartenevano ad un sierotipo non determinato (ND), gli altri 12 ad altri sierotipi (1, 2, 7, 9). Tra i ceppi precedentemente classificati come sierotipo ND mediante multiplex PCR, 9/12 sono risultati appartenenti a capsulotipi diversi dai target della PCR (*cps* 16, 8, 18, 4, 3, 29), in 2/12 casi è stato identificato un *novel capsular locus* (NCL1), compatibile con un nuovo tipo capsulare non rilevabile mediante i saggi di tipizzazione convenzionali; il restante isolato è risultato privo del locus *cps*, suggerendo una variante con fenotipo acapsulato. Gli altri ceppi (12/24), appartenenti ai sierotipi 1, 2, 7 e 9, hanno mostrato una piena concordanza tra tipizzazione molecolare convenzionale e l'assegnazione genomica del locus *cps*. L'analisi MLST ha evidenziato un'elevata eterogeneità genetica complessiva, con identificazione di molteplici ST, ed un 50% di nuovi ST (12/24), senza evidenza di un singolo clone dominante. Tale eterogeneità è stata registrata anche nei due ceppi NCL1.

Circa i determinanti genetici di resistenza, i ceppi caratterizzati da MIC elevate per la kanamicina hanno mostrato una buona concordanza tra fenotipo e genotipo, con identificazione di geni codificanti per AME (aminoglycoside-modifying enzymes) quali *ant(6)-Ia* e *aph(3')-IIIa*, in combinazione, nell'85,7% degli isolati con MIC per la kanamicina  $\geq 500$   $\mu\text{g/ml}$  (6/7). Al contrario, l'analisi bioinformatica eseguita sui ceppi con ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici non ha identificato geni di resistenza acquisiti noti, suggerendo che il fenotipo osservato possa esser sostenuto da meccanismi alternativi, coerenti con variazioni strutturali delle proteine leganti la penicillina (PBP).

n	cps (PCR)	cps (NGS)	marker di virulenza	ST	Geni per la resistenza agli antibiotici				
					AG	MLS	TET	FEN	OXA-LZD
1	7	7	mrp+/sly-/epf-	29	-	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
2	ND	16	mrp-/sly-/epf-	New	-	<i>ermB</i> , <i>lsaE</i>	<i>tetO</i>	-	-
3	9	9	mrp+/sly+/epf-	123	<i>AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia</i>	<i>ermB</i>	-	-	-
4	ND	8	mrp+/sly+/epf-	1546	-	-	-	-	-
5	2	2	mrp+/sly+/epf+	7	-	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
6	1	1	mrp+/sly+/epf-	New	-	-	<i>tetO</i>	-	-
7	7	7	mrp+/sly+/epf-	New	-	-	-	-	-
8	2	2	mrp-/sly-/epf-	New	<i>ANT(6)-Ia</i> , <i>APH(3')-IIIa</i>	<i>ermB</i>	<i>tetW</i>	-	-
9	1	1	mrp-/sly+/epf-	13	-	<i>ermB</i>	-	-	-
10	ND	18	mrp-/sly-/epf-	1549	<i>AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia</i> , <i>ANT(6)-Ia</i> , <i>APH(3')-IIIa</i>	<i>ermB</i>	<i>tetW</i>	-	-
11	ND	NCL1	mrp-/sly-/epf-	New	<i>ANT(6)-Ia</i>	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
12	ND	4	mrp+/sly+/epf-	94	-	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
13	ND	4	mrp-/sly+/epf-	94	-	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
14	ND	3	mrp-/sly-/epf-	2791	<i>AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia</i>	-	-	-	-
15	1	1	mrp-/sly+/epf-	New	-	<i>ermB</i> , <i>SAT-4</i> , <i>aad(6)</i>	<i>tetO</i>	-	-
16	ND	16	mrp-/sly-/epf-	New	<i>AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia</i> , <i>ANT(6)-Ia</i> , <i>APH(3')-IIIa</i>	<i>ermB</i>	-	-	<i>optrA</i>
17	9	9	mrp+/sly+/epf-	New	-	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
18	ND	3	mrp-/sly+/epf-	New	-	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
19	ND	eps -	mrp-/sly-/epf-	New	-	<i>ermB</i>	-	-	-
20	ND	29	mrp-/sly-/epf-	New	-	<i>mefE</i>	-	<i>fexA</i>	<i>optrA</i>
21	7	7	mrp+/sly-/epf-	7	-	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
22	9	9	mrp-/sly+/epf-	147	<i>AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia</i>	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
23	ND	NCL1	mrp-/sly-/epf-	New	<i>ANT(6)-Ia</i>	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	-	-
24	1	1	mrp-/sly+/epf-	13	-	<i>ermB</i>	-	-	-

**Tabella 2.** Caratterizzazione genomica e dei determinanti di resistenza antimicrobica in 24 isolati di *S. suis* mediante WGS. I geni di resistenza sono riportati per classe antibiotica: AG (aminoglicosidi), MLS (macrolidi–lincosamidi–streptogramine), TET (tetracicline), FEN (fenicolici), OXA-LZD (ossazolidinoni); “-” indica assenza di geni rilevati.

**Table 2.** Genomic characterization and antimicrobial resistance determinants in 24 *S. suis* isolated by WGS. Resistance genes are reported by antibiotic class: AG (aminoglycosides), MLS (macrolides–lincosamides–streptogramins), TET (tetracyclines), FEN (phenicols), OXA-LZD (oxazolidinones); “-” indicates absence of detected resistance genes.

## DISCUSSIONE

Il presente studio fornisce un aggiornamento epidemiologico sulla popolazione di *S. suis* circolante negli allevamenti suini del Nord Italia nel periodo 2021–2025, integrando dati su sierotipi, profili di virulenza e resistenze antimicrobiche. I risultati evidenziano dinamiche evolutive temporali, di particolare rilevanza per il comparto suinicolo e in un'ottica One Health. La prevalenza dei sierotipi 9 e 2 è coerente con quanto riportato in letteratura (Gottschalk et al., 2010; Segura et al., 2020), che identifica questi sierotipi come i principali responsabili di malattia clinica nel suino. In particolare, nei nostri dati il virulotipo MRP<sup>+</sup>/SLY<sup>+</sup>/EPF<sup>-</sup> associato ai sierotipi 2 e 9 ha mostrato una persistenza stabile in specifici allevamenti per più anni consecutivi (2022–2024), suggerendo la presenza di cloni adattati e capaci di mantenersi nel tempo all'interno della stessa realtà produttiva. Inoltre, l'analisi dei marker di virulenza ha confermato una forte associazione sierotipo-virulotipo, con il profilo MRP<sup>+</sup>/SLY<sup>+</sup>/EPF<sup>+</sup> quasi esclusivamente associato al sierotipo 2, confermando il ruolo di specifici assetti genetici nella definizione di lineaggi ad alto rischio, capaci di persistere nel tempo negli allevamenti (Fittipaldi et al., 2012; Willemse et al., 2019). Parallelamente, la quota rilevante di isolati ND, con comparsa più evidente a partire dal 2023 e un incremento nel biennio 2024–2025, suggerisce la possibile circolazione di varianti emergenti o meno caratterizzate, in linea con le evidenze recenti sulla crescente diversità genetica di *S. suis* (Cucco et al., 2022).

L'elemento di maggiore novità del presente lavoro riguarda tuttavia l'analisi temporale della sensibilità agli antibiotici. Rispetto ai dati disponibili in letteratura, che documentano l'andamento della resistenza alla penicillina fino al 2021 (Massacci et al., 2024), il presente studio estende l'osservazione fino al 2025, fornendo un aggiornamento sull'evoluzione più recente della sensibilità ai  $\beta$ -lattamici nella popolazione di *S. suis* circolante negli allevamenti italiani, e la estende anche alle cefalosporine di I e III generazione.

Sebbene ad oggi si considerano tali molecole come efficaci in quanto complessivamente attive nei confronti di *S. suis*, l'analisi dei valori di MIC nel nostro studio retrospettivo ha evidenziato un trend crescente, che si riflette in un aumento progressivo della percentuale di isolati classificati come resistenti o NWT. Questo andamento è stato confermato sia dall'analisi dei valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ), che mostrano una chiara tendenza all'aumento, sia dai modelli di regressione logistica, che hanno evidenziato associazioni significative tra anno di isolamento e resistenza già dal 2024–2025. La convergenza tra approcci statistici differenti, sia qualitativi che quantitativi, rafforza la solidità di questa osservazione e suggerisce che la riduzione di sensibilità ai  $\beta$ -lattamici non rappresenti un evento sporadico, ma un fenomeno in evoluzione. Tuttavia, la resistenza ai  $\beta$ -lattamici osservata fenotipicamente non è stata associata a geni di resistenza agli antibiotici, ma più probabilmente a mutazioni nei geni target (PBP) che risultano il meccanismo principale di ridotta sensibilità a queste molecole coerente con quanto riportato in letteratura (Massacci et al., 2024). La resistenza alla kanamicina invece ha mostrato una chiara corrispondenza genotipo–fenotipo grazie all'identificazione di geni AME nell'85,7% dei ceppi con kanamicina con MIC  $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ , che tuttavia rispondono ad un profilo evolutivo legato ad acquisizione orizzontale (Dechène-Tempier et al., 2021).

I risultati del sequenziamento genomico dei ceppi ND consentono di chiarire ulteriormente la natura eterogenea di questa popolazione e di rafforzare l'interpretazione dei trend fenotipici osservati. Su 12 ceppi ND selezionati per la presenza di valori elevati di MIC per la kanamicina e/o per i  $\beta$ -lattamici, il 75% degli isolati sono risultati appartenere a capsulotipi già descritti in letteratura ma non rilevabile mediante tipizzazione molecolare convenzionale (Goyette-Desjardins et al., 2020; Rieckmann et al., 2018; Zhu et al., 2024). Solo un isolato è risultato privo del locus *cps*, mentre in 2 casi è stato identificato un

*novel capsular locus* (NCL1), compatibile con un nuovo tipo capsulare, già riportato in letteratura (Cucco et al., 2022; Králová et al., 2024). Questi dati indicano che il numero di ceppi ND osservato nel presente studio comprende principalmente tipi capsulari emergenti.

## CONCLUSIONI

Il presente studio fornisce un aggiornamento epidemiologico su *S. suis* negli allevamenti suini del Nord Italia nel periodo 2021–2025, confermando la predominanza dei sierotipi 9 e 2 e l'emergere di nuovi capsulotipi circolanti.

L'analisi integrata dei dati di sensibilità antimicrobica ha evidenziato uno spostamento progressivo dei valori di MIC dei  $\beta$ -lattamici e degli aminoglicosidi verso concentrazioni più elevate, accompagnato da un aumento della probabilità di resistenza negli anni più recenti. Nel complesso, i risultati suggeriscono una dinamica evolutiva in atto nella popolazione di *S. suis* circolante negli allevamenti. Il lavoro mostra le potenzialità legate ai nuovi strumenti diagnostici disponibili che, grazie a sistemi di identificazione e di caratterizzazione avanzati e condivisi, e a sistemi di registrazione univoci, permettono di effettuare una sorveglianza continua degli agenti patogeni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009 10:1 10, 421-. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
2. Cucco, L., Panicià, 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 - Volume 28, Number 1—January 2022 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 28, 139–147. <https://doi.org/10.3201/EID2801.210816>
3. Dechène-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* 2021, Vol. 9, 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>
4. Dutkiewicz, J., Sroka, J., Zajac, V., Wasiński, B., Cisak, E., Sawczyn, A., Kloc, A., Wójcik-Fatla, A., 2017. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I – Epidemiology. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 24, 683–695. <https://doi.org/10.26444/AAEM/79813>
5. Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D., Gottschalk, M., 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol.* 7, 259–279. <https://doi.org/10.2217/FMB.11.149> ;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:IFMB20;WGROU:STRING:PUBLICATION
6. Gottschalk, M., Xu, J., Calzas, C., Segura, M., 2010. *Streptococcus Suis*: A New Emerging or an Old Neglected Zoonotic Pathogen? *Future Microbiol.* 5, 371–391. <https://doi.org/10.2217/FMB.10.2>
7. Goyette-Desjardins, G., Auger, J.P., Dolbec, D., Vinogradov, E., Okura, M., Takamatsu, D., van Calsteren, M.R., Gottschalk, M., Segura, M., 2020. Comparative Study of Immunogenic Properties of Purified Capsular Polysaccharides from *Streptococcus suis* Serotypes 3, 7, 8, and 9: the Serotype 3 Polysaccharide Induces an Opsonizing IgG Response. *Infect. Immun.* 88. <https://doi.org/10.1128/IAI.00377-20>
8. Hernandez-Garcia, J., Wang, J., Restif, O., Holmes, M.A., Mather, A.E., Weinert, L.A., Wileman, T.M., Thomson, J.R., Langford, P.R., Wren, B.W., Rycroft, A., Maskell, D.J., Tucker, A.W., 2017. Patterns of antimicrobial resistance in *Streptococcus suis* isolates

- from pigs with or without streptococcal disease in England between 2009 and 2014. *Vet. Microbiol.* 207, 117–124. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2017.06.002>
9. King, S.J., Heath, P.J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C.G., Whatmore, A.M., 2001. Distribution and genetic diversity of suilysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. *Infect. Immun.* 69, 7572–7582. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7572-7582.2001>
  10. Králová, N., Fittipaldi, N., Zouharová, M., Nedbalcová, K., Matiašková, K., Gebauer, J., Kulich, P., Šimek, B., Matiašovic, J., 2024. *Streptococcus suis* strains with novel and previously undescribed capsular loci circulate in Europe. *Vet. Microbiol.* 298, 110265. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2024.110265>
  11. Massacci, F.R., Cucco, L., Panicciá, M., Luppi, A., Albini, E., Peruzzo, A., Ferroni, L., Ustulin, M., Orsini, M., Magistrali, C.F., 2024. *Streptococcus suis* serotype 9 in Italy: genomic insights into high-risk clones with emerging resistance to penicillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 79, 403–411. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAD395>
  12. MIC EUCAST, 2026 URL [https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=431&search%5Bdisk\\_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50](https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=431&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50) (accessed 2.4.26).
  13. Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C., Gottschalk, M., Takamatsu, D., 2014. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1714–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.03411-13>
  14. Palmieri, C., Varaldo, P.E., Facinelli, B., 2011. *Streptococcus suis*, an emerging drug-resistant animal and human pathogen. *Front. Microbiol.* 2, 16700. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00235/BIBTEX>
  15. Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., Korobeynikov, A., 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 70. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
  16. Rieckmann, K., Seydel, A., Szewczyk, K., Klimke, K., Rungelrath, V., Baums, C.G., 2018. *Streptococcus suis* cps7: an emerging virulent sequence type (ST29) shows a distinct, IgM-determined pattern of bacterial survival in blood of piglets during the early adaptive immune response after weaning. *Vet. Res.* 49, 48. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0544-8>
  17. Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
  18. Segura, M., 2015. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. *Expert Rev. Vaccines* 14, 1587–1608. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1101349>
  19. Segura, M., Aragon, V., Brockmeier, S.L., Gebhart, C., de Greeff, A., Kerdsin, A., O’Dea, M.A., Okura, M., Saléry, M., Schultsz, C., Valentin-Weigand, P., Weinert, L.A., 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* 2020, Vol. 9, Page 374 9, 374. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9050374>
  20. Silva, L.M.G., Baums, C.G., Rehm, T., Wisselink, H.J., Goethe, R., Valentin-Weigand, P., 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet. Microbiol.* 115, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.013>
  21. Willemse, N., van der Ark, K.C.H., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H., Picavet, D.I., van Solt-Smits, C., Wisselink, H.J., Schultsz, C., de Greeff, A., 2019. Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. *Scientific Reports* 2019 9:1 9, 15429-. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0>

22. Wisselink, H.J., Reek, F.H., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M.A., E. Smith, H., 1999. Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. *Vet. Microbiol.* 67, 143–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00036-X)
23. Zhu, J., Wang, J., Kang, W., Zhang, X., Kerdsin, A., Yao, H., Zheng, H., Wu, Z., 2024. *Streptococcus suis* serotype 4: a population with the potential pathogenicity in humans and pigs. *Emerg. Microbes Infect.* 13. <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2352435>; PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER

# APPLICAZIONE DELLA SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IN TRASFORMATA DI FOURIER (FT-IR) PER LA DISCRIMINAZIONE DEI SIEROTIPI DI STREPTOCOCCUS SUIS

## *APPLICATION OF FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR) TO DISCRIMINATE SEROTYPES OF STREPTOCOCCUS SUIS*

MASSACCI F.R.<sup>1</sup>, CORDOVANA M.<sup>2</sup>, CUCCO L.<sup>1</sup>, ALBINI E.<sup>1</sup>, PIERSANTI F.<sup>1</sup>,  
LEO P.<sup>2</sup>, BALDACCINI A.<sup>2</sup>, LUPPI A.<sup>3</sup>, VIO D.<sup>4</sup>, PANICCIÀ M.<sup>1</sup>, PEZZOTTI G.<sup>1</sup>,  
MAGISTRALI C.F.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati",  
via G. Salvemini 1, 06126 Perugia, Italia;

<sup>2</sup>Bruker Daltonics GMBH & CO. KG, Bremen, Germany;

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
"Bruno Ubertini", via Bianchi, 9 - 25124 Brescia, Italy

<sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10,  
35020 Legnaro, Italy

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR, sierotipi  
**Key Words:** *Streptococcus suis*, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR, serotypes

### RIASSUNTO

*Streptococcus suis* rappresenta un importante patogeno nei suini ed è considerato un agente zoonotico emergente. La sierotipizzazione riveste un ruolo cruciale ai fini epidemiologici, patogenetici e vaccinali. Il presente studio ha valutato l'applicabilità della spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR), mediante lo strumento IR Biotyper, per la discriminazione sierotipica di 94 isolati di *S. suis* appartenenti a 13 sierotipi diversi. L'analisi della regione spettrale 1300–800 cm<sup>-1</sup> ha evidenziato il maggiore potere discriminante. Le analisi PCA/LDA hanno mostrato una chiara separazione tra i sierotipi testati, ad eccezione dei sierotipi 1/2 e 2. Il classificatore ha evidenziato un'accuratezza del 91%, incrementata al 98,9% considerando come unica categoria i sierotipi 2 e 1/2. I risultati dimostrano che la spettroscopia FT-IR costituisce uno strumento affidabile, rapido ed economicamente vantaggioso per la discriminazione dei sierotipi di *S. suis*. Le sue elevate prestazioni, la facilità d'uso e la compatibilità con approcci di *machine learning* ne supportano la potenziale implementazione nei flussi di lavoro diagnostici ed epidemiologici di routine. Come già osservato per altri batteri di rilevanza clinica, la FT-IR potrebbe rappresentare un valido metodo complementare alla tipizzazione molecolare, in particolare nei contesti in cui siano richieste rapidità decisionale e analisi ad alto rendimento.

### ABSTRACT

*Streptococcus suis* is a major swine pathogen and is considered as an emerging zoonotic agent. Serotyping plays a crucial role for epidemiological investigations, pathogenicity assessment, and vaccine strategy. The present study evaluated the applicability of Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy, using the IR Biotyper system, for the serotype discrimination of 94 *S. suis* isolates belonging to 13 distinct serotypes. Analysis of the 1300–800 cm<sup>-1</sup> spectral region demonstrated the highest discriminatory power. PCA/LDA analyses showed clear separation among the tested serotypes, except for serotypes 1/2 and 2. The

classifier achieved an overall accuracy of 91%, which increased to 98.9% when serotypes 2 and 1/2 were considered as a single category. These findings demonstrate that FT-IR spectroscopy represents a reliable, rapid, and cost-effective tool for *S. suis* serotype discrimination. Its high performance, ease of use, and compatibility with machine learning approaches support its potential implementation in routine diagnostic and epidemiological workflows. As previously reported for other clinically relevant bacteria, FT-IR may serve as a valuable complementary method to molecular typing, particularly in settings requiring rapid decision-making and high-throughput analysis.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* rappresenta un importante patogeno nei suini ed è considerato un agente zoonotico emergente (Princivalli *et al.*, 2009; Palmieri *et al.*, 2011; Willemse *et al.*, 2016; Segura *et al.*, 2017). Questo batterio costituisce un abitante naturale del tratto respiratorio superiore dei suini ed è endemico in tutti i Paesi produttori di suini. Nei suini, *S. suis* è responsabile di meningite, setticemia, polisierosite, artrite ed endocardite, soprattutto nel periodo post-svezzamento, causando gravi perdite economiche in allevamento (Segura *et al.*, 2017). Nell'uomo, l'infezione si acquisisce in seguito a contatto professionale oppure tramite l'ingestione di prodotti derivati dal suino non adeguatamente cotti ed è associata a meningite, endocardite, setticemia, sordità e morte (Dong *et al.*, 2017).

Fino al 2005, *S. suis* era suddiviso in 35 sierotipi (SS1–34 e 1/2), sulla base dei polisaccaridi capsulari; tuttavia, sei sierotipi sono stati recentemente riclassificati come appartenenti ad altre specie del genere *Streptococcus*. Attualmente, sono riconosciuti 29 sierotipi di *S. suis* (Louise Prüfer *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020). La maggior parte delle infezioni da *S. suis* nell'uomo e nel suino è attribuibile al sierotipo 2 (SS2), sebbene i sierotipi predominanti responsabili di malattia invasiva nei suini varino in relazione al periodo storico e all'area geografica (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014a). In alcuni Paesi europei, inclusa l'Italia, il sierotipo 9 (SS9) è emerso quale principale causa di patologie invasive nei suini (Blume *et al.*, 2009; Goyette-Desjardins *et al.*, 2014a; Segura *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2018). La maggior parte dei casi di malattia del suino in Italia sono causati dai sierotipi 9 e 1/2, ma altri sierotipi, come il 7, sono frequentemente identificati, contribuendo alla notevole eterogeneità caratteristica di questa specie microbica (Cucco *et al.*, 2022).

Sierotipi diversi da SS2 risultano meno frequentemente responsabili di casi umani (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014a). È degno di nota che, nonostante l'aumento della frequenza di infezioni suine causate da SS9, il primo caso umano attribuibile a questo sierotipo è stato documentato in Thailandia nel 2015 (Kerdsin *et al.*, 2017).

L'identificazione del sierotipo di *S. suis* è quindi rilevante non solo ai fini epidemiologici, ma anche per valutare le capacità patogenetiche e zoonotiche di un isolato. La caratterizzazione del sierotipo di appartenenza è inoltre un prerequisito nella scelta del vaccino. Infatti, i presidi ad oggi disponibili in Europa sono basati sull'impiego di batterine, che non garantiscono cross-protezione tra sierotipi differenti (Segura, 2015).

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR) è un metodo fenotipico comunemente impiegato in ambito chimico per determinare la composizione molecolare di un'ampia varietà di campioni. Il principio operativo della FT-IR si fonda sull'utilizzo delle peculiari caratteristiche di assorbimento dei legami covalenti presenti nei diversi gruppi funzionali nella regione dell'infrarosso. Questa tecnica, rapida, semplice ed economica è stata recentemente applicata con successo in diversi ambiti della microbiologia, producendo risultati significativi e contribuendo a innovare aspetti della ricerca e della diagnostica microbiologica (Kassem *et al.*, 2023). Il principio fondamentale della spettroscopia FT-IR risiede nell'interazione tra la radiazione infrarossa e le vibrazioni molecolari: ciascun

gruppo funzionale possiede un'energia vibrazionale caratteristica e, quando una radiazione infrarossa di frequenza corrispondente interagisce con la molecola, può determinare variazioni del momento dipolare, con conseguente assorbimento della radiazione (Fiore and Pellerito, 2021). L'analisi di tale pattern di assorbimento lungo uno spettro di frequenze infrarosse genera una "impronta digitale" caratteristica, riflesso di un profilo di assorbimento unico. Le assorbanze combinate di molecole quali lipidi, proteine e carboidrati producono un'impronta distintiva per ciascuna cellula microbica (Naumann, 2000; Baker *et al.*, 2014; Novais *et al.*, 2019) configurando una firma IR altamente specifica, applicabile all'identificazione dal livello di genere fino a quello di specie, e persino di sierotipo/sierotipo e ceppo (Quintelas *et al.*, 2018; Novais *et al.*, 2019; Cercenado, 2023; Kassem *et al.*, 2023; Sinha *et al.*, 2023). In virtù di una capacità discriminativa comparabile a quella dei metodi molecolari, tale tecnica è stata inoltre impiegata con successo nella gestione di focolai nosocomiali e nella sorveglianza routinaria delle correlazioni clonali tra isolati batterici (Baker *et al.*, 2014; Quintelas *et al.*, 2018; Cordovana *et al.*, 2022; Guerrero-Lozano *et al.*, 2022; Wang-Wang *et al.*, 2022; Savini *et al.*, 2023).

Una conoscenza approfondita dei ceppi circolanti di *S. suis* è essenziale sia per la sorveglianza epidemiologica sia per il controllo della malattia. Il presente studio si è posto l'obiettivo di valutare l'applicabilità dell'IR Biotyper (IRBT), un sistema commerciale basato su FT-IRS, per la discriminazione dei ceppi di *S. suis* in base al sierotipo di appartenenza.

## **MATERIALI E METODI**

### **Isolamento batterico**

Sono stati analizzati complessivamente 94 ceppi di *S. suis*, includendo anche un ceppo di riferimento (ATCC43765), isolati da suinetti affetti da meningite (63), pericardite (1), artrite (5), setticemia (19) e polmonite (4), e appartenevano a 13 sierotipi e 23 *Sequence Types* (ST) (Tabella 1).

L'identificazione di *S. suis* è stata effettuata mediante PCR (Okwumabua *et al.*, 2003) e la maggior parte degli isolati era già stata sottoposta a sequenziamento dell'intero genoma in studi precedenti (Cucco *et al.*, 2022; Massacci *et al.*, 2023).

### **Preparazione dei campioni**

I campioni sono stati seminati su agar sangue al 5% di pecora (Biolife Italiana Srl, Milano, Italia) con il 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C per 24 ore. Le colonie  $\alpha$ -emolitiche sono state selezionate e confermate come appartenenti alla specie *S. suis* mediante spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics GmbH, Brema, Germania).

L'analisi FTIR è stata eseguita mediante il sistema IR Biotyper® (IRBT – Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Brema, Germania). La preparazione dei campioni per l'analisi IRBT è stata effettuata secondo le istruzioni del produttore. In breve, un'ansa da 1  $\mu$ l di coltura batterica è stata distribuita omogeneamente in 4 repliche tecniche sulla piastra in silicio a 96 pozzetti del sistema IR Biotyper. La piastra è stata successivamente irradiata con raggi UV per 15 minuti.

Per ciascuna seduta analitica, il controllo di qualità è stato eseguito utilizzando gli standard Infrared Test Standards (IRTS 1 e 2) forniti nel kit IR Biotyper (Bruker Daltonics). Tutte le fasi di preparazione dei campioni e di acquisizione delle misure IRBT sono state condotte su banco da laboratorio standard, in condizioni ambientali di laboratorio, senza controllo specifico di temperatura o umidità.

### **Acquisizione degli spettri e analisi dei dati**

Gli spettri sono stati acquisiti ed elaborati mediante il software OPUS v8.2 e IR Biotyper

Client software v4.0 (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Brema, Germania), utilizzando le impostazioni predefinite raccomandate dal produttore. Gli spettri sono stati acquisiti nell'intero intervallo del medio infrarosso (4000–500  $\text{cm}^{-1}$ ).

Dopo l'acquisizione, è stata calcolata la derivata seconda dei valori di assorbanza su 9 punti dati mediante algoritmo di Savitzky–Golay. Gli spettri sono stati quindi normalizzati mediante vettorizzazione e successivamente interpolati in modo da ottenere un punto dati per ciascun numero d'onda intero.

Sono state investigate le regioni spettrali corrispondenti all'assorbimento della radiazione infrarossa da parte delle principali classi di macromolecole biologiche (carboidrati: 1200–900  $\text{cm}^{-1}$ ; lipidi: 3200–2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1500–1400  $\text{cm}^{-1}$ ; proteine: 1800–1500  $\text{cm}^{-1}$ ) al fine di individuare quelle con maggiore potere discriminante. La regione spettrale 1300–800  $\text{cm}^{-1}$ , impostata come predefinita nel software IR Biotyper, ha mostrato il miglior potere discriminante ed è stata pertanto utilizzata per l'analisi di similarità mediante analisi gerarchica dei cluster (HCA), analisi delle componenti principali (PCA) e analisi discriminante lineare (LDA), algoritmi implementati nel software IR Biotyper per applicazione automatizzata.

### **Machine learning e sviluppo di classificatori automatizzati**

Le capacità della intelligenza artificiale del software IRBT sono state impiegate per sviluppare un classificatore per la differenziazione di *S. suis* a livello di sierotipo. Sono stati testati tre differenti algoritmi di machine learning: *support vector machine con kernel* lineare (linear SVM), *support vector machine* con funzione a base radiale (RBF SVM) e rete neurale artificiale (ANN). Tali algoritmi, ampiamente consolidati e derivati da librerie Java open source, sono implementati nel software IR Biotyper. Per ciascuno di essi è possibile impostare solo un numero limitato di parametri da parte dell'utente (fattore di costo (C) per linear e RBF SVM e numero di cicli di addestramento per ANN).

Gli algoritmi sono stati addestrati utilizzando un set di isolati ben caratterizzati, al fine di “apprendere” le caratteristiche specifiche di ciascuna classe, quali i sierotipi degli isolati di *S. suis*. È stata eseguita una validazione incrociata a quattro fold per verificare l'accuratezza predittiva.

Il processo di classificazione si basa sull'attribuzione ai campioni incogniti di una delle classi incluse nel dataset di addestramento, secondo il modello calcolato dall'algoritmo. Il risultato della classificazione viene fornito mediante un sistema di punteggio a “semaforo” (verde–giallo–rosso), correlato all'affidabilità della classificazione. I valori soglia per la definizione delle tre categorie sono stati estrapolati dalla distribuzione dei valori outlier della coorte di validazione, considerando l'indice di Youden.

Un “*green score*” indica che lo spettro del campione si colloca all'interno dello spazio spettrale del *training set* (elevata affidabilità); un “*yellow score*” indica che lo spettro si colloca alla periferia dello spazio spettrale del *training set* (affidabilità moderata); un “*red score*” indica che lo spettro del campione è distante dagli spettri di qualsiasi classe inclusa nel training set e pertanto non può essere considerato affidabile.

Nel presente studio, l'approccio di *machine learning* è stato applicato a (90 ceppi), al fine di valutare la possibilità di sviluppare un modello predittivo automatico (classificatore). Differenti algoritmi di *machine learning*, inclusi nel software IR Biotyper™, sono stati testati.

## **RISULTATI**

### **Analisi esplorativa dei dati**

L'esame dell'intero dataset nella regione spettrale compresa tra 1300 e 800  $\text{cm}^{-1}$  ha evidenziato il più elevato potere discriminante per la distinzione dei sierotipi di *S. suis*. In particolare,

l'analisi PCA/LDA mediante *scatterplot* tridimensionale ha mostrato una separazione ben definita dei sierotipi 4, 7, 9, 10 e 23 (Figure 1 - 4).

La separazione dei sierogruppi 1, 1/2, 2, 5, 8, 9, 1-14, 15 e 19 è chiaramente osservabile nel *deviation plot*, nel quale sono rappresentate tutte le dimensioni utilizzate per la discriminazione delle classi IR nello spazio multidimensionale (Figura 2).

Ciascun gruppo risulta discriminabile rispetto agli altri in almeno una dimensione, ad eccezione dei sierotipi 1/2 e 2 e dei sierotipi 1 e 1-14, che risultano indistinguibili (Figure 3-4).

### **Analisi in machine learning**

L'algoritmo di *machine learning* che ha mostrato le migliori prestazioni è risultato essere la *Radial Basis Function Support Vector Machine* (RBF SVM), con parametri  $C = 10$  e  $\text{gamma} = 0,0001$  (Figura 5). Il classificatore ha evidenziato un'accuratezza del 91% considerando i sierotipi 2 e 1/2 come classi distinte (86/94 isolati), con 4 isolati di sierotipo 2 classificati come 1/2, 1 isolato di sierotipo 1/2 classificato come 2, 2 isolati di sierotipo 2 classificati come "mixed" e l'unico isolato di sierotipo 19 classificato come sierotipo 9.

Tuttavia, considerando i sierotipi 2 e 1/2 come un'unica classe, l'accuratezza ha raggiunto il 98,9% (93/94 isolati).

### **DISCUSSIONE**

Nel presente studio, la spettroscopia FT-IR si è dimostrata uno strumento fenotipico robusto e affidabile per la discriminazione dei sierotipi di *S. suis*. La possibilità di differenziare accuratamente i sierotipi mediante un approccio rapido, basato su coltura e a costi contenuti rappresenta un progresso significativo sia per la microbiologia diagnostica sia per la sorveglianza epidemiologica, in considerazione della rilevanza zoonosica e dell'eterogeneità genetica di *S. suis*.

La spettroscopia FT-IR consente di acquisire l'impronta biochimica globale delle cellule batteriche, riflettendo variazioni in carboidrati, proteine, lipidi e acidi nucleici. In *S. suis*, i polisaccaridi capsulari costituiscono le principali strutture determinanti il sierotipo, e la loro composizione biochimica è nota per variare significativamente tra i diversi sierotipi. Tali differenze strutturali sono prevedibilmente in grado di influenzare in modo marcato i pattern di assorbimento infrarosso, in particolare nelle regioni spettrali dominate dai carboidrati ( $1.200-900 \text{ cm}^{-1}$ ), comunemente associate alla composizione capsulare e all'architettura della parete cellulare. I nostri risultati confermano che questa regione spettrale contribuisce in misura sostanziale alla discriminazione dei sierotipi, in accordo con precedenti studi di tipizzazione batterica basati su FT-IR focalizzati su polisaccaridi superficiali e strutture dell'involucro cellulare (Quintelas *et al.*, 2018; Novais *et al.*, 2019).

Il clustering efficace degli isolati di *S. suis* in base al sierotipo risulta particolarmente rilevante alla luce delle limitazioni associate ai metodi convenzionali di sierotipizzazione. La sierotipizzazione classica basata sulla rilevazione mediante PCR dei geni coinvolti nella sintesi dei polisaccaridi capsulari è soggetta a reazioni crociate e spesso non consente di classificare varianti non tipizzabili o nuove (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014b; Athey *et al.*, 2016) it is a zoonotic agent causing severe infections to people in close contact with infected pigs or pork-derived products. Although considered sporadic in the past, human *S. suis* infections have been reported during the last 45 years, with two large outbreaks recorded in China. In fact, the number of reported human cases has significantly increased in recent years. In this review, we present the worldwide distribution of serotypes and sequence types (STs). Il sequenziamento dell'intero genoma offre una tipizzazione ad alta risoluzione, ma rimane oneroso e dispendioso in termini di tempo per l'impiego routinario in diagnostica. In questo contesto, la FT-IR rappresenta un approccio complementare di grande potenzialità,

che combina rapidità, riproducibilità e potere discriminante, risultando particolarmente adatto a screening ad alto rendimento.

I nostri risultati sono coerenti con studi precedenti che hanno dimostrato la capacità della spettroscopia FT-IR di discriminare taxa batterici a livello di sottospecie o sierotipo. La FT-IR è stata applicata con successo alla differenziazione dei sierotipi di *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*, mostrando frequentemente un'elevata concordanza con i metodi di tipizzazione molecolare (Davis and Mauer, 2011; Cordovana *et al.*, 2022; Wang-Wang *et al.*, 2022; Kon *et al.*, 2024)1/2b, 4b, and 4c. In *S. suis*, in cui la composizione capsulare rappresenta un determinante chiave della virulenza e della specificità d'ospite, la sensibilità biochimica della FT-IR offre un chiaro vantaggio rispetto ai metodi puramente genetici, che potrebbero non riflettere pienamente la variabilità fenotipica.

L'impiego di approcci statistici multivariati e di algoritmi di *machine learning* ha ulteriormente potenziato la capacità discriminante dei dati FT-IR. Ciò conferma che i dati spettrali FT-IR contengono informazioni discriminanti sufficienti a supportare sistemi di classificazione automatizzati, potenzialmente implementabili nella routine dei laboratori diagnostici anche in assenza di infrastrutture bioinformatiche avanzate.

Dal punto di vista epidemiologico, la capacità di distinguere rapidamente i sierotipi di *S. suis* riveste un'importanza primaria. Alcuni sierotipi, in particolare il sierotipo 2 e il sierotipo 9, sono fortemente associati a malattia invasiva sia nei suini che nell'uomo, mentre altri sono più frequentemente correlati a portatori asintomatici. L'identificazione rapida del sierotipo è pertanto essenziale per le indagini sui focolai, la scelta del presidio vaccinale, la sorveglianza del rischio zoonosico e il monitoraggio di ceppi emergenti. Rispetto agli approcci molecolari, la FT-IR offre tempi di risposta più brevi e costi operativi inferiori, risultando particolarmente idonea per programmi di sorveglianza su larga scala e per lo screening in tempo reale durante eventi epidemici.

Tuttavia, è opportuno riconoscere alcune limitazioni. Come per altri metodi fenotipici, le prestazioni della FT-IR possono essere influenzate dalle condizioni di coltura, dalla preparazione del campione e dalla variabilità biologica tra i ceppi. Inoltre, sierotipi strettamente correlati e caratterizzati da differenze capsulari minime possono occasionalmente mostrare una parziale sovrapposizione spettrale. L'ampliamento delle librerie di riferimento e l'incremento del numero di isolati ben caratterizzati saranno fondamentali per migliorare ulteriormente la robustezza della classificazione. L'integrazione della FT-IR con dati genomici potrebbe inoltre rappresentare un approccio combinato di grande valore, capace di coniugare la rapidità della spettroscopia con l'elevata risoluzione del sequenziamento.

In conclusione, il presente studio dimostra che la spettroscopia FT-IR costituisce uno strumento affidabile, rapido ed economicamente vantaggioso per la discriminazione dei sierotipi di *S. suis*. Le sue elevate prestazioni, la facilità d'uso e la compatibilità con approcci di *machine learning* ne supportano la potenziale implementazione nei flussi di lavoro diagnostici ed epidemiologici di routine. Come già osservato per altri batteri di rilevanza clinica, la FT-IR potrebbe rappresentare un valido metodo complementare alla tipizzazione molecolare, in particolare nei contesti in cui siano richieste rapidità decisionale e analisi ad alto rendimento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Athey, T.B.T., Teatero, S., Lacouture, S., Takamatsu, D., Gottschalk, M., Fittipaldi, N., 2016. Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. *BMC Microbiol.* 16, 162. doi:10.1186/s12866-016-0782-8
2. Baker, M.J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H.J., Dorling, K.M., Fielden, P.R., Fogarty, S.W., Fullwood, N.J., Heys, K.A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch,

- P.L., Obinaju, B., Sockalingum, G.D., Sulé-Suso, J., Strong, R.J., Walsh, M.J., Wood, B.R., Gardner, P., Martin, F.L., 2014. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protoc.* 9, 1771–1791. doi:10.1038/nprot.2014.110
3. 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.
  4. Cercenado, E., 2023. What are the most relevant publications in Clinical Microbiology in the last two years? *Rev. Esp. Quimioter. Publ. Of. la Soc. Esp. Quimioter.* 36 Suppl 1, 64–67. doi:10.37201/req/s01.15.2023
  5. Cordovana, M., Mauder, N., Join-Lambert, O., Gravey, F., LeHello, S., Auzou, M., Pitti, M., Zoppi, S., Buhl, M., Steinmann, J., Frickmann, H., Dekker, D., Funashima, Y., Nagasawa, Z., Soki, J., Orosz, L., Veloo, A.C., Justesen, U.S., Holt, H.M., Liberatore, A., Ambretti, S., Pongolini, S., Soliani, L., Wille, A., Rojak, S., Hagen, R.M., May, J., Pranada, A.B., Kostrzewa, M., 2022. Machine learning-based typing of *Salmonella enterica* O-serogroups by the Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy-based IR Biotyper system. *J. Microbiol. Methods* 201, 106564. doi:10.1016/j.mimet.2022.106564
  6. Cucco, L., Panicià, 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
  7. Davis, R., Mauer, L.J., 2011. Subtyping of *Listeria monocytogenes* at the haplotype level by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 150, 140–149. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.024
  8. Dong, W., Zhu, Y., Ma, Y., Ma, J., Zhang, Y., Yuan, L., Pan, Z., Wu, Z., Yao, H., 2017. Multilocus sequence typing and virulence genotyping of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates revealed high genetic and virulence diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, 1–8. doi:10.1093/femsle/fnx192
  9. Fiore, T., Pellerito, C., 2021. Infrared absorption spectroscopy. *Spectrosc. Mater. Charact.* 129–167.
  10. Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M., 2014a. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg. Microbes Infect.* 3, e45. doi:10.1038/emi.2014.45
  11. Goyette-Desjardins, G., Auger, J.P., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M., 2014b. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg. Microbes Infect.* 3. doi:10.1038/emi.2014.45
  12. Guerrero-Lozano, I., Galán-Sánchez, F., Rodríguez-Iglesias, M., 2022. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool for surveillance in local stewardship antimicrobial program: a retrospective study in a nosocomial *Acinetobacter baumannii* outbreak. *Brazilian J. Microbiol.* [publication Brazilian Soc. Microbiol. 53, 1349–1353. doi:10.1007/s42770-022-00774-6
  13. Kassem, A., Abbas, L., Coutinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel, K., Li, X., Tiquia-Arashiro, S., 2023. Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. *Front. Microbiol.* 14, 1304081. doi:10.3389/fmicb.2023.1304081
  14. Kerdsin, A., Hatrongjit, R., Gottschalk, M., Takeuchi, D., Hamada, S., Akeda, Y., Oishi, K., 2017. Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. *J. Microbiol.*

- Immunol. Infect. 50, 545–546. doi:10.1016/j.jmii.2015.06.011
15. Kon, H., Lurie-Weinberger, M.N., Lugassy, C., Chen, D., Schechner, V., Schwaber, M.J., Hussein, K., Alon, T., Tarabeia, J., Hamo, M., Firan, I., Aboalhega, W., Lomansov, E., Mendelsohn, S., Keren-Paz, A., Carmeli, Y., 2024. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for real-time outbreak investigation of OXA-48-producing *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 79, 349–353. doi:10.1093/jac/dkad387
  16. Louise Prüfer, T., Rohde, J., Verspohl, J., Rohde, M., De Greeff, A., Willenborg, J., Valentin-Weigand, P., 2019. Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996–2016. *PLoS One* 14, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0210801
  17. Massacci, F.R., Cucco, L., Paniciá, 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
  18. Naumann, D., 2000. Infrared spectroscopy in microbiology. *Encycl. Anal. Chem.* 102, 131.
  19. Novais, Â., Freitas, A.R., Rodrigues, C., Peixe, L., 2019. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 38, 427–448. doi:10.1007/s10096-018-3431-3
  20. Okwumabua, O., O'Connor, M., Shull, E., 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 79–84. doi:10.1111/j.1574-6968.2003.tb11501.x
  21. 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
  22. 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
  23. Quintelas, C., Ferreira, E.C., Lopes, J.A., Sousa, C., 2018. An Overview of the Evolution of Infrared Spectroscopy Applied to Bacterial Typing. *Biotechnol. J.* 13. doi:10.1002/biot.201700449
  24. Savini, F., Romano, A., Giacometti, F., Indio, V., Pitti, M., Decastelli, L., Devalle, P.L., Gorrasi, I.S.R., Miaglia, S., Serraino, A., 2023. Investigation of a *Staphylococcus aureus* sequence type 72 food poisoning outbreak associated with food-handler contamination in Italy. *Zoonoses Public Health* 70, 411–419. doi:10.1111/zph.13046
  25. Segura, M., 2015. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. *Expert Rev. Vaccines* 14, 1587–1608. doi:10.1586/14760584.2015.1101349
  26. Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., Gottschalk, M., 2017. Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends Microbiol.* 25, 585–599. doi:10.1016/j.tim.2017.02.005
  27. Silva, L.M.G., Baums, C.G., Rehm, T., Wisselink, H.J., Goethe, R., Valentin-Weigand, P., Rieckmann, K., Seydel, A., Szewczyk, K., Klimke, K., Rungelrath, V., Baums, C.G., Seele, J., Singpiel, A., Spoerry, C., Pawel-Rammingen, U. Von, Valentin-Weigand, P., Baums, C.G., Scali, F., Santucci, G., Maisano, A.M., Giudici, F., Guadagno, F., Tonni, M., Amicabile, A., Formenti, N., Giacomini, E., Lazzaro, M., Bontempi, G., Vitale, N., Alban, L., Dewulf, J., Ianieri, A., Ghidini, S., Belluzzi, G., Candela, L., Maggio, A.,

- Pasquali, P., Borrello, S., Alborali, G.L., Rieckmann, K., Seydel, A., Klose, K., Alber, G., Baums, C.G., Schütze, N., Tedde, M.T., Pilo, C., Frongia, M., Orru, G., Ruggeri, C., Liciardi, M., Princivalli, M.S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., Magistrali, C., Facinelli, B., Giuridicamente, R., Roma, I.C., Nizza, R.V.I.A., Princivalli, M.S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., Magistrali, C., Facinelli, B., Ágoston, Z., Terhes, G., Hannauer, P., Gajdács, M., Urbán, E., Wisselink, H.J., Smith, H.E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., Vecht, U., Li, Y., Metcalf, B.J., Chochua, S., Li, Z., Gertz, R.E., Walker, H., Hawkins, P.A., Tran, T., Whitney, C.G., McGee, L., Beall, B.W., van Hout, J., Heuvelink, A., Gonggrijp, M., Varghese, R., Neeravi, A., Subramanian, N., Baskar, P., Anandhan, K., Veeraraghavan, B., Bojarska, A., Janas, K., Pejsak, Z., Otulak-Kozielek, K., Garbaczewska, G., Hryniewicz, W., Sadowy, E., Hayes, A., Lacey, J.A., Morris, J.M., Goyette-Desjardins, G., Auger, J.P., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M., Blume, V., Luque, I., Vela, A.I., Borge, C., Maldonado, A., Domínguez, L., Tarradas, C., Fernández-Garayzábal, J.F., Tan, J.M., Tan, J.M., Zeng, Y., Li, H., Yang, Q., Zhou, R., Husbandry, A., Science, V., Academy, J., Microbiology, A., Medicine, V., Production, S.P., Disease, A., Tan, M., Husbandry, A., Science, V., Academy, J., Sciences, A., Zhou, R., Medicine, V., Estrada, A.A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., Marthaler, D.G., O’Dea, M.A., Laird, T., Abraham, R., Jordan, D., Lugsomya, K., Fitt, L., Gottschalk, M., Truswell, A., Abraham, S., Estrada, A.A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., Marthaler, D.G., 2020. Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype. *Vet. Microbiol.* 57, 1–12. doi:10.1128/JCM.00377-19
28. Sinha, S., Jeyaseelan, C., Singh, G., Munjal, T., Paul, D., 2023. Spectroscopy—Principle, types, and applications, in: *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*. Elsevier, pp. 145–164.
29. Wang-Wang, J.H., Bordoy, A.E., Martró, E., Quesada, M.D., Pérez-Vázquez, M., Guerrero-Murillo, M., Tiburcio, A., Navarro, M., Castellà, L., Sopena, N., Casas, I., Saludes, V., Giménez, M., Cardona, P.-J., 2022. Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreaks in the Hospital Setting. *Front. Microbiol.* 13, 897161. doi:10.3389/fmicb.2022.897161
30. 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
31. 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

**Tabella 1.** Elenco dei ceppi analizzati nello studio.**Table 1.** List of strains analyzed in the study.

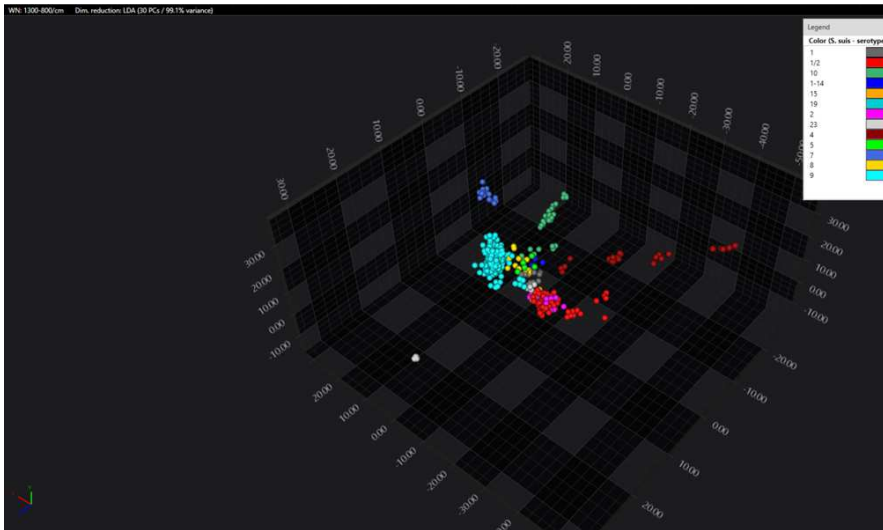
<b>Isolati</b>	<b>Anno</b>	<b>Organo di isolamento</b>	<b>Sierotipo</b>	<b>Sequence Type (ST)</b>
S121	2017	Cervello	23	108
S126	2017	Cervello	2	ND
S127	2017	Cervello	1/2	1
S129	2017	Cervello	9	123
S136	2017	ND	9	1541
S138	2017	Cuore	1/2	1
S145	2017	Cervello	4	1543
S146	2017	Cervello	9	123
S147	2017	Cervello	1	11
S148	2017	Cervello	1/2	7
S153	2018	Fegato	2	1
S159	2018	Cervello	10	1547
S161	2018	Rene	1/2	1
S163	2018	Rene	8	1545
S164	2018	Cervello	10	1547
S165	2018	Cervello	1/2	1
S166	2018	Cervello	15	1548
S186	2018	Rene	19	1549
S225	2018	Cervello	2	7
S241	2018	Milza	9	123
S250	2018	Rene	1/2	1
S271	2018	Cervello	9	123
S273	2018	Cervello	4	94
S284	2018	Cervello	1/2	7
S299	2018	Cervello	9	1540
S302	2018	Cervello	9	1540
S304	2018	Polmone	5	1544
S306	2018	Cervello	9	123
S308	2018	Cervello	10	1547
S309	2018	Cervello	9	123
S311	2018	Rene	4	94
S312	2018	Rene	8	1546
S313	2018	Rene	9	123
S314	2018	Rene	1/2	1
S315	2018	Rene	4	1544
S317	2018	Rene	1/2	1
S318	2018	Cervello	1/2	7
S320	2018	Rene	1/2	7
S321	2018	Cervello	10	1547
S322	2018	Cervello	10	1547
S323	2018	Cervello	10	1547
S324	2019	Articolazione	1	11
S33	2007	Polmone	2	1
S336	2019	Cervello	1/2	1
S350	2019	Cervello	1/2	1

S361	2019	Articolazione	1/2	1
S365	2019	Fegato	9	123
S367	2019	Cervello	2	ND
S368	2019	Cervello	1/2	1
S374	2019	Polmone	2	7
S408	2019	Cervello	1/2	1
S412	2019	Cervello	9	123
S414	2019	Cervello	2	1
S417	2019	Cervello	7	29
S424	2019	Cervello	2	7
S425	2019	Cervello	9	123
S426	2019	Cervello	9	123
S427	2019	Cervello	9	123
S429	2019	Cervello	2	1
S430	2019	Cervello	9	94
S431	2019	Cervello	7	29
S432	2019	Cervello	7	29
S435	2019	Cervello	9	123
S437	2019	Cervello	9	123
S438	2019	Cervello	9	123
S445	2020	ND	4	ND
S447	2020	Cervello	9	1540
S475	2020	Articolazione	9	1953
S483	2020	Cervello	23	ND
S484	2020	Cervello	8	3239
S485	2020	Cervello	9	1953
S494	2020	Cervello	9	123
S495	2020	Cervello	1–14	3242
S524	2020	Cervello	9	123
S530	2020	Cervello	9	1546
S541	2021	Articolazione	1–14	ND
S547	2021	Cervello	9	1540
S548	2021	Cervello	8	3244
S551	2021	Cervello	9	1540
S579	2005	Cervello	9	16
S580	2002	Polmone	9	1956
S584	2008	Milza	9	1957
S593	2021	Cervello	9	123
S596	2021	Cervello	9	123
S597	2021	Cervello	9	16
S598	2021	Fegato	2	ND
S599	2021	Cervello	9	16
S600	2019	Cervello	9	94
S601	2019	Pericardio	9	94
S602	2021	Milza	9	94
S684	2022	Cervello	9	123
S694	2022	Cervello	9	1540

ND: not determined

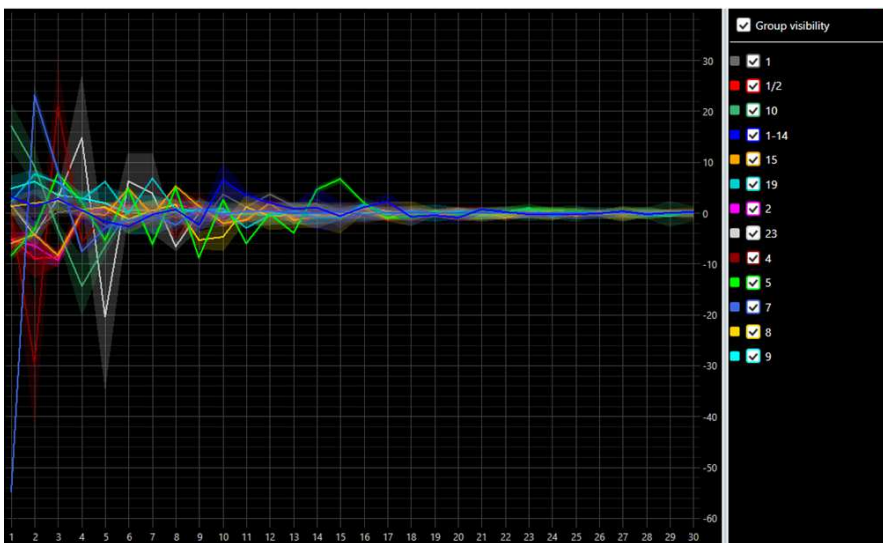
**Figura 1.** Scatterplot tridimensionale PCA/LDA che mostra il clustering dei sierotipi di *S. suis* ottenuto mediante IR Biotyper. Ogni forma geometrica rappresenta uno spettro (sono state riportate tutte le repliche), mentre il colore identifica i diversi sierotipi. L'analisi LDA è stata eseguita utilizzando 30 componenti principali, che spiegano complessivamente il 99,1% della varianza.

**Figure 1.** 3D PCA/LDA scatterplot showing the IR Biotyper clustering of *S. suis* serotypes. Each geometrical form represents a spectrum (all replicates were plotted), with colour indicating different serotypes. LDA was done using 30 principal components, which covers a variance of 99.1%.

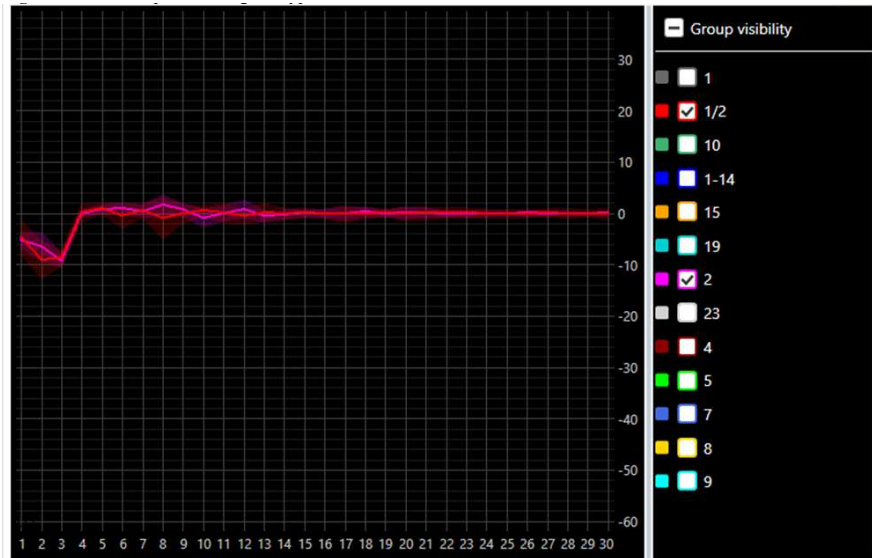


**Figura 2.** Deviation plot che mostra la separazione di tutti gli isolati di *S. suis* nello spazio spettrale IR multidimensionale.

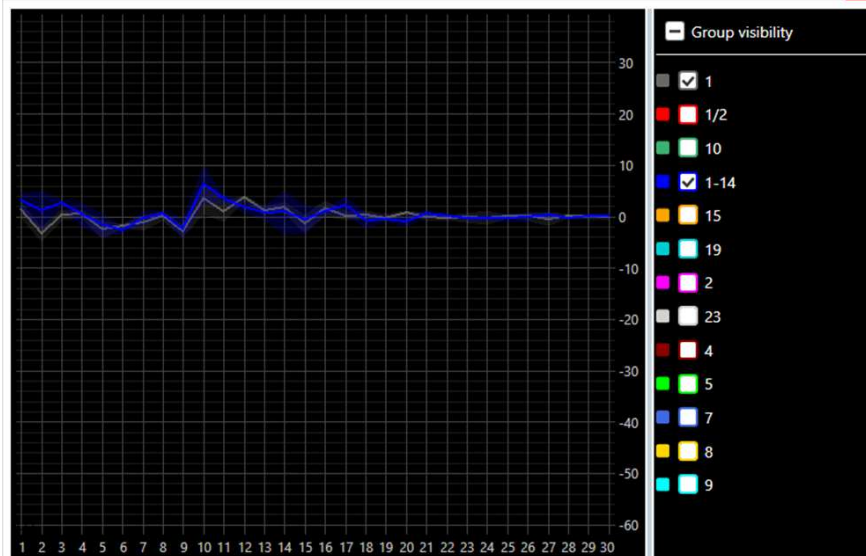
**Figure 2.** Deviation plot showing the separation of all the *S. suis* in the multidimensional IR spectral space.



**Figura 3.** Deviation plot che mostra la distribuzione dei sierotipi 2 e 1/2.  
**Figure 3.** Deviation plot showing serotypes 2 and 1/2.



**Figura 4.** Deviation plot che mostra la distribuzione dei sierotipi 1 e 1-14.  
**Figure 4.** Deviation plot showing serotypes 1 and 1-14.



**Figura 5.** Prestazioni del classificatore SVM RBF. I numeri nei riquadri corrispondono al numero di isolati.

**Figure 5.** Performance of the RBF SVM classifier. The numbers in the box correspond to the number of isolates.

	1	1/2	10	15	2	23	4	5	7	8	9	uncertain	Class recall
1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
1/2	-	15	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	94%
10	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
15	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0%
2	-	4	-	-	4	-	-	-	-	-	-	2	40%
23	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	100%
4	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	100%
5	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	100%
7	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	100%
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	100%
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	-	100%
Class precision	100%	79%	100%	100%	80%	100%	100%	100%	100%	100%	98%		

Accuracy: 91%  Show amount  Show frequency

Spectrum based  Isolate based



Close

# SALMONELLA TYPHIMURIUM LATTOSIO-POSITIVA DI ORIGINE SUINA: CRITICITÀ DIAGNOSTICHE E DATI GENOMICI

## LACTOSE-POSITIVE SALMONELLA TYPHIMURIUM IN SWINE: DIAGNOSTIC PITFALLS AND GENOMIC DATA

DILIO G.<sup>1</sup>; MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>; GAZZOLA A.<sup>1</sup>; VENTURA S.<sup>1</sup>; BARBIERI I.<sup>1</sup>;  
PONGOLINI S.<sup>1</sup>; SCALTRITI E.<sup>1</sup>; BRACCHI C.<sup>1</sup>; D'INCAU M.<sup>1</sup>; BARCO L.<sup>2</sup>;  
LOSASSO C.<sup>2</sup>; SALARIS S.<sup>2</sup>; CORNAGGIA M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna  
"B. Ubertini", Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia (BS);

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 - 35020  
Legnaro (PD);

**Parole chiave:** *Salmonella* Typhimurium; suino; lattosio-positiva

**Key words:** *Salmonella* Thyphimurium; pig; lactose-positive

### Riassunto

*Salmonella* Typhimurium è un importante patogeno zoonotico frequentemente associato alla produzione suinicola e ai casi di salmonellosi umana. Le varianti lattosio-positive (Lac<sup>+</sup>) sono rare (<1% degli isolati) e possono determinare errori diagnostici a causa della morfologia atipica delle colonie sui terreni selettivi; le colonie possono infatti essere erroneamente interpretate come *Escherichia coli* ed essere escluse da successive indagini. Nel presente lavoro è descritto l'isolamento di un ceppo di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, variante monofasica 1,4,[5],12:i:- da tessuto polmonare di un suino. L'isolato è stato sottoposto ad un'approfondita caratterizzazione mediante metodiche fenotipiche, determinazione della sensibilità agli antimicrobici e Whole Genome Sequencing (WGS). Il ceppo è risultato appartenere al Sequence Type ST34; l'analisi genomica ha evidenziato la presenza di un operone *lac* completo e ha mostrato un profilo di multiresistenza estesa agli antimicrobici, con un numero limitato di opzioni terapeutiche residue. Il rinvenimento di un ceppo di *Salmonella* lattosio-positiva multiresistente in ambito suinicolo mette in evidenza il rischio di sottodiagnosi associato a fenotipi atipici che possono facilmente sfuggire ai protocolli di screening routinari basati sulla fermentazione del lattosio e sulla produzione di H<sub>2</sub>S. Sottolinea inoltre la necessità di affiancare ai sistemi di sorveglianza tradizionali approcci genomici avanzati.

### Abstract

*Salmonella* Typhimurium is a major zoonotic pathogen frequently associated with swine production and human salmonellosis. Lactose-positive (Lac<sup>+</sup>) variants are rare (<1% of isolates) and may lead to diagnostic errors due to atypical colony morphology on selective media. In fact, these atypical colonies may be misidentified as *Escherichia coli* and consequently excluded from other testing. In the present study, we report the isolation of a strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, monophasic variant 1,4,[5],12:i:- from swine lung tissue. The isolate was subjected to comprehensive characterization using phenotypic methods, antimicrobial susceptibility testing, and Whole-Genome Sequencing (WGS). The strain was assigned to sequence type ST34; genomic analysis revealed the presence of a complete *lac* operon and demonstrated an extensive multidrug-resistant profile, with a limited number of remaining therapeutic options. The detection of a lactose-positive, multidrug-

resistant *Salmonella* strain in the swine sector highlights the risk of underdiagnosis associated with atypical phenotypes that may easily escape routine screening protocols based on lactose fermentation and H<sub>2</sub>S production and underlines the need to complement traditional surveillance systems with advanced genomic approaches.

## INTRODUZIONE

*Salmonella enterica* rappresenta uno dei principali agenti eziologici di zoonosi a trasmissione alimentare a livello europeo e globale. Tra i sierotipi di maggiore rilevanza epidemiologica, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ST34 (Wu et al., 2025), in particolare la variante monofasica 1,4,[5],12:i:-, è frequentemente associata alla produzione suinicola ed è annoverata tra i serovar più comunemente isolati sia nei casi di salmonellosi umana, sia lungo la filiera alimentare (Liu et al., 2025; Napoleoni et al., 2023). Tale variante è inoltre spesso caratterizzata da profili di multiresistenza agli antimicrobici, che ne accrescono l'impatto in termini di sanità pubblica e sicurezza alimentare. Una recente meta-analisi ha evidenziato che *Salmonella enterica* 1,4,[5],12:i:- risulta associata a tassi molto elevati di resistenza agli antimicrobici, con percentuali di resistenza a tetracicline, ampicillina, sulfonamidi e streptomina  $\geq 75\%$  e un tasso complessivo di multiresistenza  $\geq 86\%$ , indicando un profilo MDR fortemente prevalente in questo serovar a livello globale (Qin et al., 2022).

Le procedure diagnostiche routinarie per l'identificazione di *Salmonella* si basano in larga misura su caratteristiche fenotipiche consolidate, tra cui la mancata fermentazione del lattosio e la produzione di H<sub>2</sub>S sui terreni selettivi. In questo contesto, la presenza di varianti lattosio-positivo (*lac*<sup>+</sup>), sebbene estremamente rara, rappresenta una potenziale criticità diagnostica. È infatti noto che la fermentazione del lattosio in *S. enterica* si osserva in una quota marginale di isolati e può determinare una morfologia atipica sui terreni selettivi comunemente utilizzati, con il rischio di errata interpretazione e conseguente esclusione degli isolati dai successivi test di conferma.

In diagnostica veterinaria, tale fenomeno assume particolare rilevanza, in quanto, in alcuni casi, le colonie lattosio-positivo possono risultare fenotipicamente indistinguibili da quelle di *Escherichia coli*, aumentando il rischio di falsi negativi e di sottostima della circolazione di *Salmonella* nei programmi di sorveglianza degli allevamenti.

Dal punto di vista genetico, la capacità di fermentare il lattosio non fa parte dell'assetto fenotipico caratteristico della *Salmonella*, ma viene acquisita mediante trasferimento genico orizzontale dell'operone *lac* da altre *Enterobacteriaceae*, dando origine a configurazioni genetiche eterogenee (Leonard et al., 2015). In particolare, l'assenza dell'operone *lac* risulta associata a un incremento della motilità e della capacità di invasione delle cellule epiteliali (Eswarappa et al., 2009; Jiang et al., 2014) mediante derepressione della sintesi dei flagelli, con un impatto diretto sui determinanti di virulenza (Jiang et al., 2014; Schmitt et al., 2001). Tuttavia, diversi assetti genetici possono consentire la fermentazione del lattosio senza un controllo repressivo completo, risultando compatibili con il mantenimento dei circuiti regolatori associati alla motilità. La presenza di ceppi lattosio-positivi è stata documentata in diversi contesti, inclusi ambienti lattiero-caseari, confermando la stabilità di questo fenotipo al di fuori di condizioni sperimentali (Blackburn and Ellis, 1973). Inoltre, studi sperimentali hanno evidenziato come la capacità di fermentare rapidamente il lattosio possa conferire un vantaggio di crescita *in vivo*, suggerendo un possibile beneficio ecologico in specifici ambienti (Wilkins and Franzese, 1971). Nel complesso, questi elementi indicano che il fenotipo lattosio-positivo in *Salmonella* non rappresenta necessariamente una condizione svantaggiosa, ma può coesistere con meccanismi di fitness e potenziale di virulenza conservati, mantenendo rilevanza epidemiologica e zoonotica.

Il comparto suinicolo, riconosciuto come uno dei principali serbatoi di *Salmonella*, riveste pertanto un ruolo centrale nella diffusione di varianti atipiche e virulente, potenzialmente in grado di sfuggire ai protocolli diagnostici standard. Alla luce di tali considerazioni, scopo del presente lavoro è descrivere il rinvenimento e la caratterizzazione di un isolato lattosio-positivo di *Salmonella* Typhimurium variante monofasica di origine suina, evidenziandone le implicazioni diagnostiche, microbiologiche e zoonotiche.

## MATERIALI E METODI

L'isolato è stato ottenuto da tessuto polmonare di suino nell'ambito di attività diagnostica routinaria, a seguito di un'ispezione post-mortem. Il campione è stato sottoposto a semina diretta mediante inoculo in brodo Brain Heart Infusion (BHI), agar MacConkey e agar sangue, incubati in aerobiosi a 37 °C per 24 ore; è stato inoltre inoculato l'agar sangue Columbia (CBA), incubato a 37 °C in atmosfera arricchita con 5% di CO<sub>2</sub>. Le colonie sospette sono state inizialmente analizzate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Al fine di approfondire il profilo biochimico atipico dell'isolato, sono stati eseguiti ulteriori test mediante semina su diversi terreni selettivi e differenziali, tra cui Triple Sugar Iron agar (TSI), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD), Brilliant Green Agar (BGA), Hektoen Enteric agar e Gassner agar, per la valutazione della fermentazione dei carboidrati e della produzione di H<sub>2</sub>S. È stata inoltre eseguita una galleria biochimica Enteropluri. La motilità batterica è stata valutata mediante inoculo su terreno MRSV utilizzando una sospensione batterica standardizzata a 0,5 McFarland, incubata a 44 °C per 24–48 ore. È stato effettuato un test di agglutinazione rapida su vetrino (Serum Plate Agglutination, SPA), ma l'identificazione definitiva è stata ottenuta mediante sierotipizzazione secondo lo schema di Kauffmann–White–Le Minor.

La sensibilità agli antimicrobici è stata valutata tramite microdiluizione in brodo utilizzando pannelli customizzati, ITISVE1 (pannello customizzato per IIZZSS, ITISVE8 Thermofisher) ed EUVSEC3 (Sensititre™ EU Surveillance *Salmonella*/*E. coli* AST plate). Per il pannello EUVSEC3, le MIC sono state interpretate secondo la seguente gerarchia: ECOFF EUCAST specifici per *Salmonella enterica* (classificazione WT/NWT); criteri EURL-AR EUVSEC3 (Fødevareinstituttet, DTU 2023) e breakpoint clinici EUCAST v16 per Enterobacterales (classificazione S/R), in assenza di valori specifici per *Salmonella*. Per enrofloxacin sono stati utilizzati gli ECOFF EUCAST per *Escherichia coli* in mancanza di riferimenti dedicati. Per il pannello ITISVE1, l'interpretazione delle MIC è stata effettuata prioritariamente secondo criteri CASFM 2019 e CLSI M100/V08; in assenza di breakpoint specifici, sono stati applicati i breakpoint EUCAST v16. Il sequenziamento dell'intero genoma è stato eseguito mediante piattaforme Illumina e Oxford Nanopore Technologies, con assemblaggio ibrido e successiva analisi bioinformatica. L'assemblato ibrido, generato con Unicycler v 0.5.0., è stato utilizzato per l'identificazione del ST secondo lo schema allelico MLST Enterobase. La presenza dell'operone *lac* è stata valutata mappando le reads genomiche sull'operone *lac* di *E. coli* (GenBank: J01636.1). L'identificazione di geni di resistenza *in silico* è stata eseguita usando il database Resfinder (v 2.6.0).

## RISULTATI

Le colonie lattosio-positive osservate su terreno selettivo differenziale (MacConkey agar) sono state inizialmente sospettate come *Escherichia coli* (Figura 1). Per prassi interna, prima di procedere all'esecuzione dell'antibiogramma, viene effettuata una conferma mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, che ha fornito un risultato inatteso, identificando l'isolato come *Salmonella* spp. Tale evidenza ha reso necessario l'approfondimento diagnostico mediante ulteriori test biochimici e microbiologici, finalizzati alla corretta caratterizzazione del ceppo.



**Figura 1.** Si osserva la crescita del ceppo oggetto di studio su tre terreni, da sinistra a destra: Mac Conkey agar (fermentazione del lattosio), XLD agar (acidificazione del pH), TSI agar slant (mancata produzione di H<sub>2</sub>S).

**Figure 1.** Growth of the study strain is observed on three culture media, from left to right: MacConkey agar (lactose fermentation), XLD agar (pH acidification), TSI agar slant (absence of H<sub>2</sub>S production).

L'isolato ha presentato un fenotipo lattosio-positivo e H<sub>2</sub>S-negativo, con un profilo biochimico atipico che ha inizialmente complicato l'identificazione basata su criteri fenotipici. Le caratteristiche culturali osservate sui diversi terreni selettivi, unite alla positività ai test di motilità (MRSV agar) e all'identificazione mediante MALDI-TOF, sono risultate compatibili con *Salmonella spp.*, successivamente confermata come *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium variante monofasica 1,4,[5],12:i:-.

L'isolato ha mostrato un fenotipo di multiresistenza estesa (Tabella 1), risultando resistente ad aminoglicosidi, aminopenicilline, cefalosporine (I), chinoloni (I), fluorochinoloni, fenicoli, sulfamidici e sulfamidici potenziati, tetracicline, macrolidi. Valori di MIC bassi e compatibili con un fenotipo wild-type sono state osservati per amikacina, cefalosporine (III), carbapenemi, colistina e amoxicillina/acido clavulanico, indicando una suscettibilità residua limitata.

Famiglia	Antibiotico	Pannello	MIC (µg/mL)	Breakpoint / ECOFF (µg/mL)	Standard	Esito
<b>Aminoglicosidi</b>	Apramicina	ITISVE1	>32	S ≤8 / R ≥16	CASFM 2019	<b>R</b>
	Gentamicina	ITISVE1	32	S ≤4 / R ≥16	CLSI M100	<b>R</b>
		EUVSEC3	>16	ECOFF 2	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
	Kanamicina	ITISVE1	>32	S ≤8 / R ≥32	CLSI M100	<b>R</b>
Amikacina	EUVSEC3	≤4	ECOFF 4	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>WT</b>	
<b>Aminopenicilline</b>	Ampicillina	ITISVE1	>32	S ≤8 / R ≥32	CLSI M100	<b>R</b>
		EUVSEC3	>32	ECOFF 4	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
<b>Aminopenicilline + inibitore</b>	Amoxicillina/ ac. clavulanico	ITISVE1	8	S ≤8 R >8	CLSI V08	<b>S</b>
<b>Cefalosporine I gen.</b>	Cefazolina	ITISVE1	8	S ≤2 / R ≥8	CLSI V08	<b>R</b>
<b>Cefalosporine III gen.</b>	Cefotaxime	ITISVE1	≤0.5	S ≤1 / R ≥2	EUCAST v16	<b>S</b>
		EUVSEC3	0.5	ECOFF 0.5	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>WT</b>
	Ceftazidime	EUVSEC3	0.5	ECOFF 2	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>WT</b>
<b>Carbapenemi</b>	Meropenem	EUVSEC3	0.06	R > 0125	EURL-AR EUVSEC3 2023	<b>S</b>
<b>Chinoloni (I)</b>	Acido nalidixico	EUVSEC3	16	ECOFF 8	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
<b>Fluorochinoloni</b>	Enrofloxacina	ITISVE1	4	ECOFF 0.125	EUCAST E. coli 04-02-2026	<b>R</b>
	Flumequina	ITISVE1	>16	S ≤2 / R ≥8	CASFM 2019	<b>R</b>
	Ciprofloxacina	EUVSEC3	1	ECOFF 0.06	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
<b>Fenicoli</b>	Florfenicolo	ITISVE1	>64	S ≤16 / R ≥32	CLSI V08	<b>R</b>
	Cloramfenicolo	EUVSEC3	>64	ECOFF 16	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
<b>Sulfamidici</b>	Sulfisoxazolo	ITISVE1	>512	S ≤256 / R ≥512	CLSI M100	<b>R</b>
	Sulfametossazolo	EUVSEC3	>512	R > 256	EURL-AR EUVSEC3 2023	<b>R</b>
<b>Sulfamidici potenziati</b>	Trimethoprim + sulfamidici	ITISVE1	>16	S ≤2 / R ≥4	CLSI V08	<b>R</b>
<b>Diaminopirimidine</b>	Trimethoprim	EUVSEC3	>16	ECOFF 2	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
<b>Tetracicline</b>	Tetraciclina	ITISVE1	>16	S ≤4 / R ≥16	CLSI V08	<b>R</b>
		EUVSEC3	>32	ECOFF 8	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
<b>Glicilcicline</b>	Tigeciclina	EUVSEC3	1	R > 0.5	EURL-AR EUVSEC3 2023	<b>R</b>
<b>Macrolidi</b>	Azitromicina	EUVSEC3	64	ECOFF 16	EUCAST S. enterica 04-02-2026	<b>NWT</b>
<b>Polimixine</b>	Colistina	ITISVE1	0.5	S ≤2 / R ≥2	EUCAST v16	<b>S</b>
		EUVSEC3	≤1	R > 2	EURL-AR EUVSEC3 2023	<b>S</b>

**Tabella 1.** Profilo di resistenza del ceppo oggetto di studio mediante l'utilizzo della combinazione dei pannelli EUVSEC3 ed ITISVE1.

**Table 1.** Antimicrobial resistance profile of the study strain determined using the combined EUVSEC3 and ITISVE1 panels.

L'assemblaggio ibrido dei dati di WGS ha consentito l'ottenimento di un genoma completo e chiuso, costituito da un cromosoma circolare e da un plasmide circolare di grandi dimensioni (circa 344 kbp). Il ceppo è risultato appartenere al sequence type ST34 e l'analisi genomica comparativa non ha evidenziato clustering con altri ceppi umani, alimentari o animali presenti sui database regionali Lombardia ed Emilia-Romagna.

L'analisi genomica ha evidenziato la presenza di un operone *lac* completo (*lacY-lacZ-lacA-lacI*), localizzato sul plasmide all'interno di un elemento genetico mobile arricchito in sequenze di inserzione (IS1, IS5075, ISYps3, ISSba14), suggerendo un'acquisizione per trasferimento genico orizzontale. Il gene *lacA* è risultato troncato (57 amminoacidi rispetto ai circa 220 attesi), configurazione già descritta in rare varianti lattosio-positive di *Salmonella* e compatibile con l'utilizzo del lattosio senza repressione dei loci associati alla motilità.

Classe antibiotica	Fenotipo complessivo (AST)	Determinanti genetici (WGS)
<b>Aminoglicosidi</b>	R/NWT eccetto amikacina	Geni <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aadA17</i>
<b>β-lattamici</b>	R/NWT eccetto cefalosporine III	β-lattamasi a spettro ristretto; <i>blaTEM-1B</i> assenza di geni ESBL, AmpC e carbapenemasi
<b>Macrolidi, Lincosamidi e Streptogramin</b>	NWT	Geni <i>mph(A)</i> , <i>lnu(F)</i>
<b>Fenicoli</b>	R/NWT	Geni <i>floR</i> , <i>catfloR</i>
<b>Tetraciline/Glicilciline</b>	R/NWT	Geni <i>tet(B)</i> , <i>tet(A)</i>
<b>Fluorochinoloni</b>	R/NWT	Determinanti PMQR <i>qnrS1</i>
<b>Quinoloni</b>	S / WT	Assenza di mutazioni QRDR
<b>Sulfamidici</b>	R	Gene <i>sul2</i>
<b>Diaminopirimidine (Trimethoprim)</b>	NWT	Gene <i>dfrA14</i>
<b>Polimixine</b>	S	Assenza di geni <i>mcr</i>

**Tabella 2.** Corrispondenza resistenza fenotipica e determinanti genetici di resistenza riscontrati mediante analisi del genotipo in WGS.

**Table 2.** Correspondence between phenotypic resistance and resistance gene determinants identified through WGS genotypic analysis.

I risultati fenotipici dell'antibiogramma complessivamente hanno mostrato un'elevata concordanza con i dati di sequenziamento genomico (WGS) a livello di classe antibiotica (Tabella 2). L'unica discrepanza rilevata riguarda l'amikacina: mentre i test fenotipici hanno evidenziato un profilo wild-type (WT), l'analisi *in silico* ha identificato la presenza del gene *aac(6')-Iaa*, noto per conferire resistenza agli aminoglicosidi, inclusa l'amikacina, come riportato nel database CARD mediante algoritmo RGI.

## DISCUSSIONE

Il rinvenimento di una *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium variante monofasica lattosio-positiva in un suino rappresenta una criticità rilevante per la diagnostica microbiologica basata su criteri fenotipici tradizionali. I protocolli routinari per l'isolamento di *Salmonella* si fondano infatti sull'assenza di fermentazione del lattosio e sulla produzione di H<sub>2</sub>S, caratteristiche che, nel caso di varianti lattosio-positive e talora H<sub>2</sub>S-negative, possono determinare un'elevata probabilità di sottodiagnosi. In questo contesto, il comparto suinicolo si configura come un potenziale serbatoio di varianti atipiche di *Salmonella* in grado di sfuggire ai protocolli di screening standard e di diffondersi silenziosamente lungo

la filiera alimentare, con implicazioni dirette per la sicurezza alimentare e la sanità pubblica (Napoleoni et al., 2023; Wu et al., 2025).

L'isolato descritto appartiene al sequence type ST34, un clone ampiamente diffuso a livello globale e frequentemente associato a profili di multiresistenza antimicrobica, in particolare nella produzione suinicola (Liu et al., 2025; Wu et al., 2025). La combinazione di un fenotipo lattosio-positivo e di un'estesa multiresistenza antimicrobica, già documentata in letteratura per la variante monofasica 1,4,[5],12:i:-, rappresenta un fattore di rischio aggiuntivo in termini di diffusione e persistenza del patogeno (Qin et al., 2022). Tali caratteristiche rafforzano l'ipotesi che ceppi atipici possano essere selezionati e mantenuti negli ecosistemi produttivi, rendendo necessario un rafforzamento delle attività di sorveglianza integrata basata su approcci genomici.

Dal punto di vista genetico, l'identificazione di un operone *lac* completo con gene *lacA* troncato è coerente con quanto descritto in rare varianti lattosio-positive di *Salmonella enterica* (Leonard et al., 2015b). È noto che la regolazione dell'operone *lac* influisca sui meccanismi di virulenza, in particolare attraverso l'interazione con i circuiti di controllo della motilità flagellare (Eswarappa et al., 2009; Jiang et al., 2014; Schmitt et al., 2001). Nel caso in esame, la presenza di un *lacA* troncato suggerisce una configurazione compatibile con l'utilizzo del lattosio senza una repressione marcata dei circuiti di motilità, consentendo potenzialmente il mantenimento del potenziale zoonotico del ceppo.

Nel complesso, i risultati ottenuti suggeriscono che il fenotipo lattosio-positivo in *Salmonella* Typhimurium variante monofasica non debba essere interpretato come una semplice anomalia biochimica, ma piuttosto come un potenziale adattamento evolutivo compatibile con la persistenza del patogeno negli allevamenti e lungo la filiera alimentare. Alla luce di tali evidenze, ulteriori approfondimenti mediante analisi del trascrittoma e modelli sperimentali in vivo appaiono necessari per chiarire il reale impatto di questo assetto genetico sui meccanismi di virulenza e sulla capacità di trasmissione zoonotica.

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro documenta il rinvenimento di una *Salmonella* Typhimurium monofasica lattosio-positiva e multiresistente in un suino. Tale evidenza conferma la necessità di mantenere elevata l'attenzione diagnostica nei confronti di fenotipi non convenzionali e di integrare le metodiche tradizionali con strumenti di genomica applicata. Un approccio di sorveglianza integrata nel comparto suinicolo risulta fondamentale per intercettare precocemente ceppi atipici e ridurre il rischio di trasmissione zoonotica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Blackburn, B.O., Ellis, E.M., 1973. Lactose-fermenting *Salmonella* from dried milk and milk-drying plants. *Appl. Microbiol.* 26, 672–674. <https://doi.org/10.1128/AM.26.5.672-674.1973>
2. Eswarappa, S.M., Karnam, G., Nagarajan, A.G., Chakraborty, S., Chakravorty, D., 2009. *lac* Repressor Is an Antivirulence Factor of *Salmonella enterica*: Its Role in the Evolution of Virulence in *Salmonella*. *PLoS One* 4, e5789. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005789>
3. Fødevareinstituttet, D., n.d. Antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter* 2023 The 31st EURL-AR Proficiency Test.
4. Jiang, L., Ni, Z., Wang, L., Feng, L., Liu, B., 2014. Loss of the *lac* Operon Contributes to *Salmonella* Invasion of Epithelial Cells Through Derepression of Flagellar Synthesis. *Current Microbiology* 2014 70:3 70, 315–323. <https://doi.org/10.1007/S00284-014-0720-7>

5. Leonard, S.R., Lacher, D.W., Lampel, K.A., 2015a. Acquisition of the lac operon by *Salmonella enterica*. *BMC Microbiology* 2015 15:1 15, 173-. <https://doi.org/10.1186/S12866-015-0511-8>
6. Liu, H., Wang, N., Angkititrakul, S., Li, W., Luo, Z., Hou, M., Wu, Y., Shi, Y., Wang, Y., Li, F., Liu, Y., Wu, X., Suksawat, F., 2025. Genomic Evidence for the Rise of *Salmonella* Typhimurium ST34 with Increased Plasmid-Mediated Resistance in the Thailand Pork Chain. *Pathogens* 2025, Vol. 14, Page 1190 14, 1190. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS14121190>
7. Napoleoni, M., Villa, L., Barco, L., Lucarelli, C., Tiengo, A., Baggio, G., Dionisi, A.M., Angellotti, A., Ferretti, E., Ruggeri, S., Staffolani, M., Rocchegiani, E., Silenzi, V., Morandi, B., Blasi, G., 2023. Monophasic Variant of *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i:- (ACSSuGmTmpSxt Type) Outbreak in Central Italy Linked to the Consumption of a Roasted Pork Product (Porchetta). *Microorganisms* 11, 2567. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11102567/S1>
8. Qin, X., Yang, M., Cai, H., Liu, Y., Gorris, L., Aslam, M.Z., Jia, K., Sun, T., Wang, X., Dong, Q., 2022. Antibiotic Resistance of *Salmonella* Typhimurium Monophasic Variant 1,4,[5],12:i:-in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040532>
9. Schmitt, C.K., Ikeda, J.S., Darnell, S.C., Watson, P.R., Bispham, J., Wallis, T.S., Weinstein, D.L., Metcalf, E.S., O'Brien, A.D., 2001. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect. Immun.* 69, 5619–5625. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5619-5625.2001>;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
10. Wilkins, T.D., Franzese, J.A., 1971. Growth advantage of fast lactose-fermenting mutants of slow lactose-fermenting coliform bacteria in gnotobiotic rats and mice. *Infect. Immun.* 4, 780–782. <https://doi.org/10.1128/IAI.4.6.780-782.1971>
11. Wu, X., Du, J., Zhou, X., Peng, X., Jia, C., Wang, B., Wu, B., Li, Y., Yue, M., 2025. Genomic epidemiology and public health implications of zoonotic monophasic *Salmonella* Typhimurium ST34. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15, 1490183. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2025.1490183/BIBTEX>

# **SIEROPREVALENZA DI SALMONELLA NEI SUINI PESANTI AL MACELLO: AGGIORNAMENTI E CLASSIFICAZIONE DEL RISCHIO IN ALLEVAMENTI ITALIANI**

## ***SEROPREVALENCE OF SALMONELLA IN HEAVY PIGS AT SLAUGHTER: UPDATES AND RISK CLASSIFICATION IN ITALIAN FARMS***

TORREGGIANI C.<sup>1</sup>, PUPILLO G.<sup>1</sup>, SONCINI A.<sup>1</sup>, D'ANNUNZIO G.<sup>1</sup>, DE LORENZI G.<sup>1</sup>, BENATTI D.<sup>2</sup>, GUAZZETTI S.<sup>3</sup>, VIO D.<sup>4</sup>, PANICCIÀ M.<sup>5</sup>, SOLIANI L.<sup>1</sup>, PROSPERI A.<sup>1</sup>, CORDIOLI B.<sup>1</sup>, CHIAPPONI C.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>, OSTANELLO F.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, IZSLER*

<sup>2</sup>*Tecnico gestione filiere, Macello OPAS*

<sup>3</sup>*AUSL Reggio Emilia*

<sup>4</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, IZSve*

<sup>5</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", IZSUM*

<sup>6</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna*

**Parole chiave:** Salmonellosi, sieroprevalenza, categorizzazione aziende

**Key Words:** salmonellosis, seroprevalence, herd categorization

### **Riassunto**

Salmonella rappresenta un rilevante patogeno enterico del suino, con impatto sanitario ed economico e importanti implicazioni per la salute pubblica. Il presente studio, condotto nell'ambito di un progetto dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, ha l'obiettivo di aggiornare i dati di sieroprevalenza nel suino pesante al macello e classificare le partite in base al rischio.

Tra febbraio 2024 e novembre 2025 sono state analizzate 624 partite provenienti da allevamenti di Lombardia (n=401) ed Emilia-Romagna (n=223), per un totale di 18.709 sieri (30 per partita), testati mediante ELISA per anticorpi anti-Salmonella. Complessivamente, 11.897 campioni sono risultati positivi (63,6%; IC95%: 62,9–64,3). La prevalenza media per partita è stata del 63,55%, con valori compresi tra 0% (4,3% delle partite) e 100% (24,0%; valore modale). I quartili della distribuzione sono risultati: Q1=36,67%; Q2=70,00%; Q3=96,67%. Il 25% delle partite presentava prevalenze superiori al 96,7%. La prevalenza media è risultata più elevata in Lombardia (65,6%) rispetto all'Emilia-Romagna (59,9%), senza differenze statisticamente significative (p=0,057).

I risultati evidenziano un'elevata sieroprevalenza nei suini pesanti al macello in Italia. Considerate le peculiarità del sistema produttivo nazionale e l'assenza di piani strutturati di controllo, tali dati costituiscono una base per l'implementazione di programmi di sorveglianza e riduzione della prevalenza lungo la filiera suinicola.

### **Abstract**

Salmonella is a major enteric pathogen in pigs, with significant animal health, economic and public health implications. This study, conducted within a research project of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, aimed to update data on seroprevalence in Italian heavy pigs at slaughter and to classify batches according to risk level. Between February 2024 and November 2025, 624 randomly selected batches from fattening farms in Lombardy (n=401) and Emilia-Romagna (n=223) were sampled at a slaughterhouse

in Emilia-Romagna. For each batch, 30 blood samples were collected at exsanguination and tested using a commercial ELISA for anti-Salmonella antibodies, yielding 18,709 sera in total. Overall, 11,897 samples tested positive (63.6%; 95% CI: 62.9–64.3). Mean batch seroprevalence was 63.55%, ranging from 0% (4.3% of batches) to 100% (24.0%; modal value). Quartiles were Q1=36.67%, Q2=70.00% and Q3=96.67%, with 25% of batches showing prevalence >96.7%. Mean prevalence was slightly higher in Lombardy (65.6%) than in Emilia-Romagna (59.9%), without statistically significant differences ( $p=0.057$ ), as confirmed by quartile distribution analysis.

These findings highlight a high seroprevalence of Salmonella in heavy pigs at slaughter in Italy and provide baseline data to support future surveillance and control programs along the pork production chain.

## INTRODUZIONE

Salmonella rappresenta uno dei principali patogeni enterici del suino ed è responsabile sia di patologie negli animali come, ad esempio, la salmonellosi setticemica sostenuta da *Salmonella* Choleraesuis e l'enterocolite associata a *S. Typhimurium* e alla sua variante monofasica 1,4,[5],12:i:- — sia di rilevanti implicazioni per la salute pubblica legate al consumo di carne suina contaminata. L'infezione comporta inoltre importanti ricadute economiche dovute all'incremento della mortalità, al rallentamento dell'accrescimento e al ricorso a trattamenti antibiotici.

Le infezioni sostenute in particolare da *S. Typhimurium* e dalla variante monofasica si manifestano frequentemente in forma subclinica, costituendo una possibile fonte di contaminazione delle carcasse al macello e, conseguentemente, un rischio per il consumatore. La salmonellosi rappresenta in Europa la seconda zoonosi gastrointestinale di origine alimentare per numero di casi notificati, dopo la campylobatteriosi. Sebbene la maggior parte dei focolai sia attribuibile a uova e ovoprodotti, alimenti misti e carne avicola, il 23,7% dei campioni di carne suina analizzati a livello comunitario è risultato positivo, con valori prossimi a quelli riscontrati nella carne di pollo (29,8%). Nel 2008, uno studio europeo aveva evidenziato una prevalenza del 10,3% nei suini al macello (EFSA, 2008); la riduzione successivamente osservata è verosimilmente correlata all'implementazione progressiva di piani di sorveglianza e controllo in diversi Paesi.

In Italia, così come in altri contesti europei, il terzo sierotipo più frequentemente isolato, dopo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, sia nell'uomo sia nelle matrici veterinarie, è *S. Typhimurium* variante monofasica 1,4,[5],12:i:-, che riconosce nel suino il principale serbatoio. L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) stima che circa il 10–20% dei casi umani nell'Unione Europea sia attribuibile alla filiera suinicola. Una riduzione dell'80–90% della prevalenza nei linfonodi dei suini regolarmente macellati potrebbe determinare una diminuzione dei casi umani associati al consumo di carne suina (EFSA, 2010).

Il Regolamento (CE) n. 2160/2003 del 17 novembre 2003 prevede l'istituzione, da parte degli Stati membri, di programmi nazionali di controllo finalizzati alla riduzione degli agenti zoonotici negli animali, tra cui Salmonella enterica nei suini.

Diversi Paesi europei — tra cui Germania, Danimarca, Olanda, Regno Unito e Irlanda — hanno adottato da tempo programmi di controllo basati prevalentemente sulla sorveglianza sierologica al macello (campioni di sangue e/o meat juice). La stima della prevalenza intra-allevamento consente di classificare gli stabilimenti in categorie di rischio e di intervenire prioritariamente su quelli con livelli sierologici più elevati. Tale categorizzazione guida l'applicazione di misure di contenimento lungo le diverse fasi del ciclo produttivo.

In Danimarca, ad esempio, nel 2010 la prevalenza nella carne suina era pari all'1,2% (Alban, 2012). In Germania, i dati di monitoraggio riportati da Merle et al. (2010) mostrano valori

intorno al 7,3% nei suini all'ingrasso nel 2000 e circa l'8% nel 2008. Le differenti condizioni epidemiologiche presenti negli allevamenti europei determinano obiettivi di controllo variabili: l'eradicazione non è perseguibile nei Paesi con prevalenze medio-alte, dove le strategie mirano principalmente alla riduzione progressiva dell'infezione.

In Italia, uno studio longitudinale condotto da Merialdi et al. (2008) ha evidenziato livelli di sieroprevalenza compresi tra il 66% e il 100%. Nonostante tali evidenze suggeriscano una diffusione significativa al macello, attualmente non risultano attivi piani nazionali strutturati e sistematici per il contenimento della Salmonella nel comparto suinicolo.

Ulteriori approfondimenti risultano necessari anche alla luce delle peculiarità del sistema produttivo italiano, caratterizzato da un peso vivo alla macellazione di 160–180 kg, con un prolungamento del ciclo di allevamento di tre o quattro mesi rispetto ad altri Paesi. Tale differenza limita la piena comparabilità dei dati epidemiologici internazionali con la realtà nazionale.

Il presente studio, inserito in una più ampia indagine condotta a livello nazionale, si propone di aggiornare il dato di sieroprevalenza di Salmonella nei suini pesanti al momento della macellazione. Parallelamente, è stata effettuata una classificazione del rischio sulla base della prevalenza sierologica rilevata per ciascuna partita esaminata.

## **MATERIALI E METODI**

### **Prelievo e analisi dei campioni**

Nell'ambito del progetto di ricerca corrente dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, dal titolo "Prevalenza di Salmonella al macello, studio dei fattori di rischio e misure per la riduzione della prevalenza nel suino", nel periodo febbraio 2024-novembre 2025 sono state analizzate 624 partite di suini, scelte in maniera casuale, provenienti da altrettanti allevamenti da ingrasso dell'Emilia-Romagna e della Lombardia e macellate in uno stabilimento dell'Emilia-Romagna. Per ogni partita sono stati analizzati 30 campioni di sangue prelevati al momento della iugulazione utilizzando il campionamento previsto dal piano per la malattia di Aujeszky. Le indagini sierologiche sono state eseguite utilizzando un test sierologico ELISA commerciale per anticorpi nei confronti di Salmonella.

### **Analisi statistica**

Preliminarmente, per ciascuna partita è stata calcolata la prevalenza di animali sieropositivi per Salmonella. Allo scopo di categorizzare le partite in funzione della proporzione di animali sieropositivi, sono stati calcolati i quartili della distribuzione delle prevalenze. Un quartile è una misura statistica che divide un insieme di dati ordinati in quattro parti uguali, ciascuna contenente il 25% delle osservazioni. Il primo quartile (Q1) è il valore al di sotto del quale si trova il 25% dei dati; il Q2 (mediana) è il valore al di sotto del quale si colloca il 50% delle osservazioni, ecc.

Arbitrariamente, lo stato sanitario delle partite con prevalenza compresa all'interno del primo quartile (Q1) è stato considerato "ottimale"; quello delle partite dei Q2, Q3 e Q4 è stato considerato, rispettivamente "buono", "preoccupante" e "pessimo". La partita è stata definita come positiva quando almeno uno dei sieri esaminati ha fornito esito positivo alla ricerca di anticorpi specifici anti-Salmonella. La proporzione di partite positive e la distribuzione dei quartili per Regione di provenienza sono state valutate utilizzando il test chi-quadrato. L'eventuale differenza della prevalenza per partita, in funzione della Regione di provenienza degli animali, è stata valutata utilizzando il test U di Mann-Whitney. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software IBM SPSS ver. 29.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA). La significatività statistica è stata fissata ad un valore di  $p < 0,05$ .

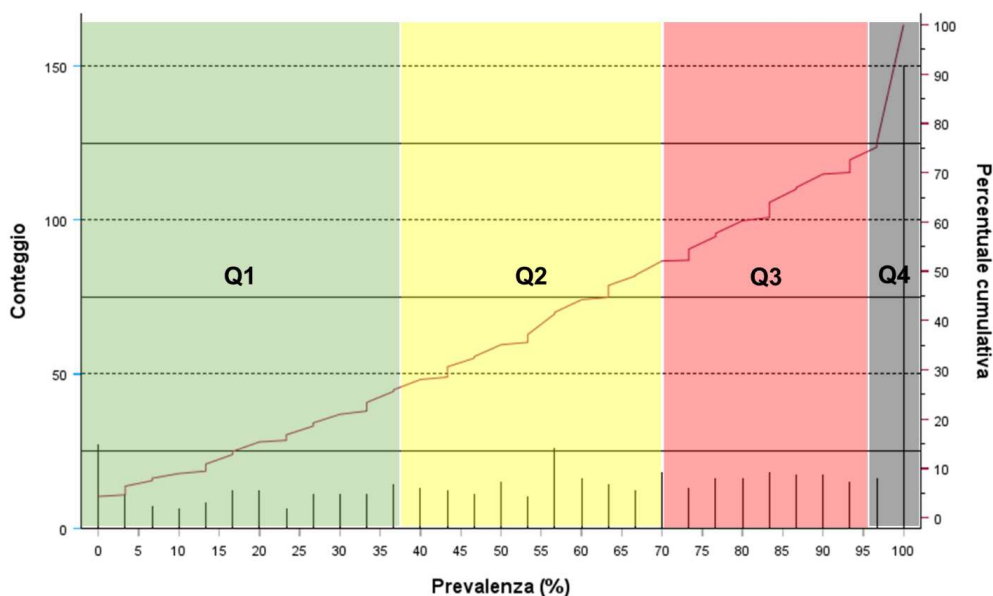
## RISULTATI

Sono state analizzate 624 partite di cui 401 provenivano da allevamenti della Lombardia e 223 da allevamenti dell'Emilia-Romagna. Al momento della iugulazione, da ciascuna partita è stato prelevato un campione di sangue da 30 soggetti scelti in maniera casuale. Complessivamente, sono stati esaminati 18709 sieri di cui 11897 sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-Salmonella (63,6%; 95%CI: 62,9-64,3).

La distribuzione dei valori di prevalenza delle partite è riportata in fig. 1.

**Figura 1.** Distribuzione dei valori di prevalenza per Salmonella (linee verticali) in ciascuna delle 67 partite esaminate e percentuale cumulativa. Le aree colorate indicano i quartili (Q) della prevalenza.

**Figure 1.** Distribution of prevalence values of Salmonella seropositive animals in each of the 67 batches examined and cumulative percentage. The shaded areas indicate the quartiles (Q) of prevalence.



La tabella 1. riporta le statistiche descrittive della prevalenza osservata nelle 624 partite. La prevalenza variava da un minimo di 0% (27 partite; 4,3%) ad un massimo del 100% (150 partite; 24,0%) che ha rappresentato il valore più frequente (moda). La media dei valori di prevalenza è stata pari al 63,6%. I quartili della distribuzione dei valori di prevalenza sono stati i seguenti; Q1: 36,7; Q2: 70,0; Q3: 96,7.

La prevalenza media è risultata leggermente più elevata nelle partite provenienti dalla Regione Lombardia (65,6%) rispetto a quella delle partite provenienti dall'Emilia-Romagna (59,9%). Tale differenza non è risultata statisticamente significativa ( $p=0,057$ ); analogamente, anche la distribuzione delle aziende all'interno dei quartili non differiva in modo significativo (tab. 2).

**Tabella 1.** Statistiche descrittive dei valori di sieroprevalenza per partita.**Table 1.** Descriptive statistics of batch-level seroprevalence values.

Media	Mediana	Moda	Valore minimo	Valore massimo	Q1	Q2	Q3
63,6	70,0	100	0	100	36,7	70,0	96,7

**Tabella 2.** Distribuzione delle partite all'interno dei quartili per Regione di provenienza degli animali.**Table 2.** Distribution of batches within quartiles by region of origin.

quartile			Regione		Totale
			Lombardia	Emilia Romagna	
Q1	Conteggio		83	63	146
	%		20,7%	28,3%	23,4%
Q2	Conteggio		106	57	163
	%		26,4%	25,6%	26,1%
Q3	Conteggio		113	52	165
	%		28,2%	23,3%	26,4%
Q4	Conteggio		99	51	150
	%		24,7%	22,9%	24,0%
Totale	Conteggio		401	223	624
	%		100,0%	100,0%	100,0%

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati indicano che nei suini pesanti all'età di macellazione, la prevalenza di capi e partite sierologicamente positive per Salmonella è particolarmente elevata: 11897 delle 18709 partite esaminate (63,6%) presentava almeno un animale sieropositivo e la media dei valori di prevalenza è stata pari a 63,6%.

La prevalenza media è risultata leggermente più elevata nelle partite provenienti dalla Regione Lombardia (65,6%) rispetto a quella delle partite provenienti dall'Emilia-Romagna (59,9%). Tale differenza non è risultata statisticamente significativa ( $p > 0,057$ ); analogamente, anche la distribuzione del numero delle partite all'interno dei quartili non differiva in modo significativo.

Prendendo in considerazione la suddivisione in quartili della sieroprevalenza, si può osservare che il primo 25% delle partite esaminate (Q1) presentava prevalenze comprese tra 0% e circa il 36,7%, mentre nei successivi quartili è stata osservata una prevalenza compresa tra il 36,7% e 70,0% (Q2) e tra il 70,0% al 96,7% (Q3). Il 25% delle partite esaminate ha presentato una prevalenza superiore al 96,7% (Q4).

In assenza di precedenti valutazioni condotte in Italia, questo studio fornisce un dato aggiornato, della prevalenza sierologica di Salmonella nei suini pesanti al momento della macellazione.

Per confrontare correttamente questi dati con quelli di altri Paesi europei, è tuttavia necessario prendere in considerazione alcuni fattori: a) in altri Paesi, i piani di controllo sono già in essere da diverso tempo e, b) l'età di macellazione è sensibilmente più bassa. I programmi applicati nei Paesi europei si basano per lo più su approccio sierologico, con eventuale approfondimento microbiologico, al fine di categorizzare gli allevamenti in funzione del rischio di Salmonella e gestire conseguentemente l'ordine di macellazione in base alla categoria di rischio sulla

base della sieroprevalenza dell'allevamento di provenienza degli animali. Negli allevamenti ad alta prevalenza vengono inoltre valutate delle misure di controllo.

Nonostante la sorveglianza degli allevamenti e la loro categorizzazione in base alla valutazione sierologica della prevalenza di Salmonella, non tutti i programmi in essere in altri Paesi europei sono obbligatori, hanno l'obiettivo della riduzione della prevalenza o prevedono sistemi di penalizzazione. Solo i programmi adottati in Danimarca e Germania prevedono sistemi di penalizzazione che riducono i pagamenti per le carcasse provenienti da allevamenti infetti.

Il programma di controllo applicato in Danimarca si basa sulla sorveglianza sierologica e sulla categorizzazione delle aziende in 3 livelli (Dahl, 2017). Nel primo livello rientrano le aziende con valori di sieroprevalenza inferiori al 40%, nel livello 2 vengono comprese le aziende con prevalenza compresa tra il 40% e il 65%; nel livello peggiore (livello 3) vengono categorizzati gli allevamenti con prevalenza >65%. La percentuale di allevamenti classificati nel livello 2 e 3 nel 2018 in Danimarca era intorno al 4% (Correia-Gomes, 2021). Il programma implementato in Germania per il monitoraggio di Salmonella è stato avviato nel 2002 dal sistema di garanzia della qualità tedesco per la filiera alimentare, il cosiddetto "QS-System" (Blaha, 2004; Merle, 2010). Il principio fondamentale del programma, basato sulle esperienze del sistema danese avviato nel 1995, è l'identificazione degli allevamenti con la più alta prevalenza di Salmonella. La prevalenza intra-allevamento viene valutata mediante test sierologico sistematico su campioni di meat juice prelevati casualmente dalle carcasse di 60 suini per allevamento nell'arco di 12 mesi.

Gli allevamenti sono classificati in tre categorie: categoria I (prevalenza nulla o bassa), con meno del 20% di campioni positivi; categoria II (prevalenza media), con più del 20% e meno del 40% di campioni positivi; categoria III (alta prevalenza), con oltre il 40% di campioni positivi. Tale categorizzazione consente ai macelli di programmare la macellazione iniziando dalle partite provenienti da allevamenti di categoria I e procedendo successivamente con quelle a maggiore rischio, al fine di ridurre la contaminazione lungo la filiera. Gli allevamenti classificati in categoria III sono tenuti ad adottare misure specifiche per la riduzione della prevalenza. Attualmente, in Germania quasi tutti gli allevamenti rientrano nella categoria II (prevalenza 20-40%). Sebbene il programma abbia carattere volontario, gli impianti di macellazione generalmente non accettano suini provenienti da allevamenti classificati in categoria III. Qualora un allevamento rientri in categoria III, viene richiesto di rivedere e aggiornare il piano di gestione sanitaria aziendale, in accordo con il veterinario aziendale, con l'obiettivo di ridurre la prevalenza e rientrare nella categoria II.

Nel lavoro di Merle et al. (2010) sono riportati diversi studi sulla sieroprevalenza di Salmonella in Germania: nel 2004 è stata osservata una sieroprevalenza dell'8% nei suini da ingrasso, mentre nel 2007 la sieroprevalenza nelle scrofe era pari a circa il 9,9%.

Il controllo di Salmonella negli allevamenti è complesso e richiede interventi su quattro ambiti principali: 1) igiene aziendale (pulizia e disinfezione, controllo dei roditori e dei vettori, gestione dei flussi di personale e veicoli, gestione delle deiezioni); 2) alimentazione (forma del mangime, granulometria, alimentazione secca o liquida) e acidificazione; 3) gestione dell'allevamento (dimensione e tipologia, sistema tutto pieno/tutto vuoto, quarantena, sistemi di stabulazione); 4) gestione sanitaria (monitoraggio sanitario, vaccinazioni e trattamenti antibiotici) (Fosse, 2009; Belœil, 2004).

La complessità e i costi associati a questi interventi spiegano probabilmente perché, in alcuni Paesi europei come Olanda, Irlanda e Belgio, dove i piani di controllo non prevedono sanzioni per gli allevamenti ad alta prevalenza, i programmi non abbiano avuto successo. In assenza di penalizzazioni, la motivazione a ridurre la prevalenza all'interno delle aziende risulta limitata (Carvajal, 2024).

In molti Paesi industrializzati sono state adottate strategie per contenere la principale zoonosi di origine alimentare, la quale, insieme alla resistenza antimicrobica e all'inquinamento ambientale derivante dai liquami, rappresenta una delle principali sfide One Health per l'industria suinicola nei prossimi anni. L'Unione Europea ha promosso iniziative con programmi obbligatori ben consolidati nel settore avicolo; tuttavia, i successi ottenuti nella produzione avicola contrastano con l'attuazione più lenta delle misure nell'industria suina. La maggiore complessità dei sistemi di allevamento, la variabilità epidemiologica delle infezioni e la carenza di strategie chiare per la mitigazione della salmonellosi hanno limitato l'efficacia dei controlli, con alcuni Paesi che non hanno introdotto alcun programma e altri che lo hanno interrotto. Va comunque sottolineato che i programmi di monitoraggio e sorveglianza forniscono dati fondamentali per ridurre il rischio di diffusione del patogeno. Il presente studio rappresenta un'analisi preliminare della sieroprevalenza di Salmonella nei suini, ma ulteriori indagini saranno necessarie per comprendere meglio la problematica e costituire una base solida per futuri programmi volti a ridurre la prevalenza di Salmonella in allevamento e lungo la filiera fino al macello.

## RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (PRC2023003).

## BIBLIOGRAFIA

1. EFSA, (2008) European Food Safety Authority, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2008.206r>
2. EFSA. (2010), "Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs." EFSA J. 8:1547. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1547
3. Regolamento (CE) N. 2160/2003 del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 17 novembre 2003, sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti.
4. Alban F.M. Baptista V. Møgelmoose, L.L. Sørensen, H. Christensen, S. Aabo, J. Dahl, (2012) Salmonella surveillance and control for finisher pigs and pork in Denmark — A case study, Food Research International, Volume 45, Issue 2, Pages 656-665, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.050>.
5. Meriardi G., Barigazzi G., Bonilauri P., Tittarelli C., Bonci M., D'incan M. and Dottori M. (2008), Longitudinal Study of *Salmonella* Infection in Italian Farrow-To-Finish Swine Herds. Zoonoses and Public Health, 55: 222-226. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01111.x>
6. Merle R., Kösters S., May T., Portschi U., Blaha T., Kreienbrock L. (2010), Serological Salmonella monitoring in German pig herds: results of the years 2003-2008. Prev Vet Med.;99(2-4):229-233. doi:10.1016/j.prevetmed.02.007
7. Dahl et al. (2017) Salmonella Control in the Pig and Pork Production in Denmark—Lessons Learnt. Disponibile online: [https://www.pig333.com/articles/salmonella-control-in-the-pig-and-pork-production-in-denmark-%E2%80%93-lessons\\_12329/#:~:text=Salmonella%20control%20in%20the%20pig%20and%20pork%20production%20in%20Denmark%20%E2%80%93%20lessons%20learnt&text=The%20success%20of%20the%20Danish,to%20control%20in%20primary%20production](https://www.pig333.com/articles/salmonella-control-in-the-pig-and-pork-production-in-denmark-%E2%80%93-lessons_12329/#:~:text=Salmonella%20control%20in%20the%20pig%20and%20pork%20production%20in%20Denmark%20%E2%80%93%20lessons%20learnt&text=The%20success%20of%20the%20Danish,to%20control%20in%20primary%20production).
8. Carvajal A., Kramer M., Argüello, H., (2024), Salmonella Control in Swine: A Thoughtful Discussion of the Pre- and Post-Harvest Control Approaches in Industrialized Countries. Animals, 14, 1035. <https://doi.org/10.3390/ani14071035>
9. Correia-Gomes, C., Leonard, F., & Graham, D. (2021). Description of control

- programmes for *Salmonella* in pigs in Europe. Progress to date? *Journal of Food Safety*, 41(5), e12916. <https://doi.org/10.1111/jfs.12916>
10. Blaha T. (2004), Bisherige Erkenntnisse aus dem QS-Salmonellenmonitoring- und -reduzierungsprogramm [Up-to-date information from the German QS salmonella monitoring and reduction programme]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*;111(8):324-326.
  11. Fosse J., Seegers H., Magras C. (2009). Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses and public health*, 56: 429-454.
  12. Belœil P.-A., Fravallo P., Fablet C., Jolly J.-P., Eveno E., Hascoet Y., Chauvin C., Salvat G., Madec F. (2004). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Preventive veterinary medicine*, 63: 103-120.

# OLTRE L'ANTIBIOTICO: VALUTAZIONE IN CAMPO DEI VACCINI STABULOGENI CONTRO *MYCOPLASMA HYORHINIS* E *MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE*

## BEYOND ANTIBIOTICS: FIELD EVALUATION OF AUTOGENOUS VACCINES AGAINST *MYCOPLASMA HYORHINIS* AND *MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE*

MERENDA M.<sup>1</sup>, PRATAVIERA D.<sup>1</sup>, MORALES-ARCE A.Y.<sup>1</sup>, PICCHI M.<sup>1</sup>,  
MAISANO A. M.<sup>2</sup>, SANTUCCI G.<sup>2</sup>, TONELLI C.<sup>3</sup>, USTULIN M.<sup>4</sup>, VIO D.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Struttura Complessa Territoriale 1, Verona

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

<sup>3</sup>Veterinario libero-professionista

<sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Struttura Complessa Territoriale 4, Pordenone

**Parole chiave:** *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, vaccino stabulogeno

**Key words:** *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, autogenous vaccine

### Riassunto

*Mycoplasma hyorhinis* (MHR) e *Mycoplasma hyosynoviae* (MHS) sono le principali cause di artrite nel suino, determinando importanti ripercussioni sia sul benessere animale che sull'economia aziendale. Non essendo disponibili vaccini commerciali in Europa, il controllo si basa principalmente sull'uso di antibiotici per il trattamento delle forme cliniche; questo può tuttavia contribuire all'insorgenza di fenomeni di antimicrobico resistenza. Lo studio ha lo scopo di valutare l'efficacia clinica di tre vaccini stabulogeni inattivati, uno nei confronti di MHR, uno nei confronti di MHS ed un vaccino bivalente contenente entrambe le valenze vaccinali, utilizzati in un allevamento suinicolo da riproduzione a ciclo chiuso con gravi casi di artrite da micoplasmi. I gruppi vaccinati hanno mostrato tassi di zoppia significativamente più bassi sia nei suinetti in lattazione sia in quelli in svezzamento per tutte le valenze vaccinali testate. Al termine della prova, l'allevamento ha adottato la vaccinazione di routine utilizzando il vaccino stabulogeno bivalente. Inoltre, tra il 2023 e il 2025 è stata osservata una tendenza generale alla riduzione dell'uso di antibiotici, in particolare delle pleuromutiline, utilizzate nei trattamenti mirati contro MHR e MHS.

### Abstract

*Mycoplasma hyorhinis* (MHR) and *Mycoplasma hyosynoviae* (MHS) are major causes of arthritis in pigs, impacting animal welfare and farm economics. With no commercial vaccines available in Europe, control typically relies on antibiotics, which can contribute to antimicrobial resistance. This study evaluated the efficacy of three different autogenous inactivated vaccines, one MHR-vaccine, one MHS-vaccine and a bivalent vaccine containing MHR+MHS. These vaccines were used in a farrow-to-finish pig farm with severe mycoplasmas arthritis cases. Two pig batches for each vaccine were involved in a vaccination trial. Vaccinated groups showed significantly lower lameness rates in both suckling and weaning pigs. Following the trial, the farm adopted routine vaccination using the bivalent autogenous vaccine. In addition, an overall reduction in antibiotic use was observed between 2023 and 2025, particularly with regard to pleuromutilins, which were used for targeted treatments against MHR and MHS.

## INTRODUZIONE

*Mycoplasma hyorhinis* (MHR) e *Mycoplasma hyosynoviae* (MHS) sono microrganismi ubiquitari ampiamente diffusi negli allevamenti suinicoli e riconosciuti come importanti agenti eziologici di patologie articolari nel suino. La loro espressione clinica e il loro ruolo patogenetico risultano fortemente condizionati dalla presenza di fattori predisponenti di natura ambientale, gestionale e immunitaria, i quali possono favorire l'instaurarsi dell'infezione e determinare lo sviluppo di quadri clinico-patologici di rilevante impatto sanitario, produttivo ed economico.

Le infezioni causate da MHR e MHS possono compromettere significativamente il benessere degli animali, determinando condizioni di dolore, zoppia e ridotta mobilità, e al contempo esercitare effetti negativi sull'economia delle aziende suinicole. Tali ripercussioni si manifestano principalmente attraverso l'aumento del numero di animali prematuramente riformati, la riduzione dell'efficienza alimentare e degli indici di conversione, nonché attraverso l'incremento dei costi di produzione associato anche alla necessità di ricorrere a trattamenti farmacologici.

Le strategie attualmente adottate per il controllo di MHR e MHS si basano prevalentemente sulla mitigazione dei fattori di rischio predisponenti e sulla gestione delle forme cliniche mediante l'impiego di antimicrobici. Questo approccio è in parte obbligato, in quanto al momento non sono disponibili in Europa vaccini commerciali specificamente autorizzati per la prevenzione delle infezioni sostenute da MHR e MHS (Palzer et al, 2020).

È importante ricordare che il trattamento antimicrobico, pur rappresentando uno strumento fondamentale per il contenimento delle manifestazioni cliniche, non è in grado di eliminare completamente i patogeni dall'organismo degli animali infetti e che il ricorso agli antibiotici contribuisce all'insorgenza e alla diffusione di fenomeni di antimicrobico-resistenza, con implicazioni rilevanti sia per la medicina veterinaria sia per la salute pubblica (Klein et al., 2022).

In questo contesto, il presente studio si pone l'obiettivo di valutare l'efficacia clinica di 3 vaccini stabulogeni, uno nei confronti di MHR, uno nei confronti di MHS ed uno bivalente contenente entrambi gli antigeni, analizzandone gli effetti sulla riduzione delle manifestazioni cliniche associate a tali infezioni. Contestualmente, il lavoro intende esaminare l'impatto della vaccinazione sull'utilizzo degli antimicrobici nell'allevamento oggetto di studio, al fine di verificare se la vaccinazione possa rappresentare una valida alternativa per limitare il ricorso ai trattamenti farmacologici.

## MATERIALE E METODI

Lo studio è stato condotto in un allevamento da riproduzione a ciclo chiuso comprendente 350 scrofe, caratterizzato da uno stato sanitario PRRS positivo-instabile e gestito secondo un sistema produttivo in bande trisettimanali. Nel novembre 2022 è stata segnalata una problematica clinica di rilevante entità, consistente nella comparsa di gonfiori articolari e forme gravi di zoppia. Tale condizione interessava circa il 20% dei soggetti per banda e coinvolgeva suinetti in diverse fasi produttive, incluse la sala parto, lo svezzamento e l'inizio del magronaggio (Merenda et al, 2023).

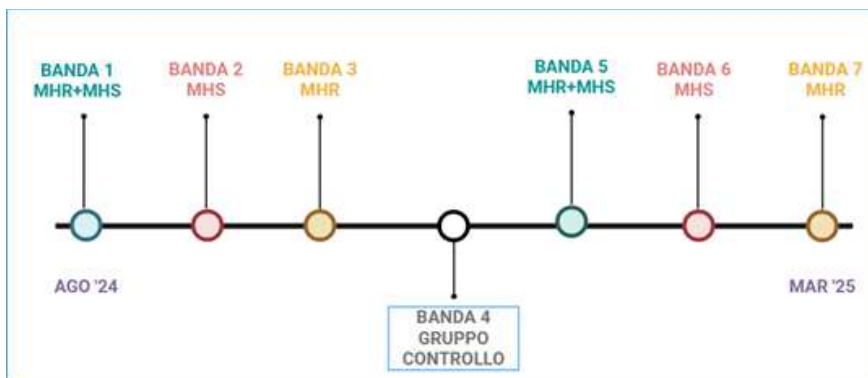
Le indagini diagnostiche effettuate per identificare l'eziologia della patologia osservata hanno evidenziato il coinvolgimento concomitante di MHR e MHS nella forma artritica. I ceppi di micoplasmi sono stati isolati dai fluidi articolari prelevati da soggetti deceduti e, previo ottenimento dell'Autorizzazione Ministeriale, sono stati utilizzati per la produzione di 3 diversi vaccini stabulogeni inattivati, uno nei confronti di MHR (vaccino MHR), uno nei confronti di MHS (vaccino MHS) e infine un vaccino bivalente contenente entrambi gli antigeni (vaccino MHR+MHS).

Tutte le prove si sono svolte nel periodo da agosto 2024 a giugno 2025.

Il protocollo vaccinale prevedeva la somministrazione di due dosi di vaccino alle scrofe gestanti prima del parto ed ai suinetti a partire dai 21 giorni di vita. Per ciascun vaccino prodotto, è stata condotta una prova di vaccinazione su due bande produttive non consecutive (Immagine 1).

In tutte le bande oggetto di studio è stato incluso un gruppo di controllo negativo costituito da soggetti non vaccinati, al fine di consentire un confronto tra animali trattati e non trattati all'interno della stessa banda.

Inoltre, tra la prime tre bande vaccinate e le seconde 3 bande è stata lasciata una banda interamente non vaccinata, al fine di valutare i dati clinici in assenza di vaccino.



**Immagine 1:** Schema temporale degli interventi vaccinali

**Image 1:** Timeline of vaccination trial

Durante il periodo di osservazione, per ciascuna banda vaccinata, sono stati raccolti dati relativi all'efficacia clinica della vaccinazione, valutata considerando il numero di suinetti che presentavano segni clinici di zoppia sia nella fase sottoscrofa sia durante lo svezzamento, confrontando tali parametri tra il gruppo vaccinato e il gruppo controllo.

Sulla base dei risultati ottenuti nella prova, la proprietà dell'allevamento, su indicazione del veterinario aziendale, ha poi deciso di integrare il vaccino bivalente MHR+MHS nella gestione sanitaria ordinaria dell'azienda a partire dal mese di marzo 2025.

Parallelamente alla valutazione clinica, è stato quindi successivamente analizzato il consumo aziendale di farmaci antimicrobici attraverso il portale ClassyFarm, utilizzando come unità di misura le DDDAit (*Defined Daily Dose Animal* per 1.000 animali al giorno). In particolare, è stato monitorato il consumo di Tiamulina, principio attivo selezionato dal veterinario aziendale per il trattamento delle infezioni da MHR e MHS nel periodo precedente alla registrazione e alla disponibilità del vaccino stabulogeno.

## RISULTATI

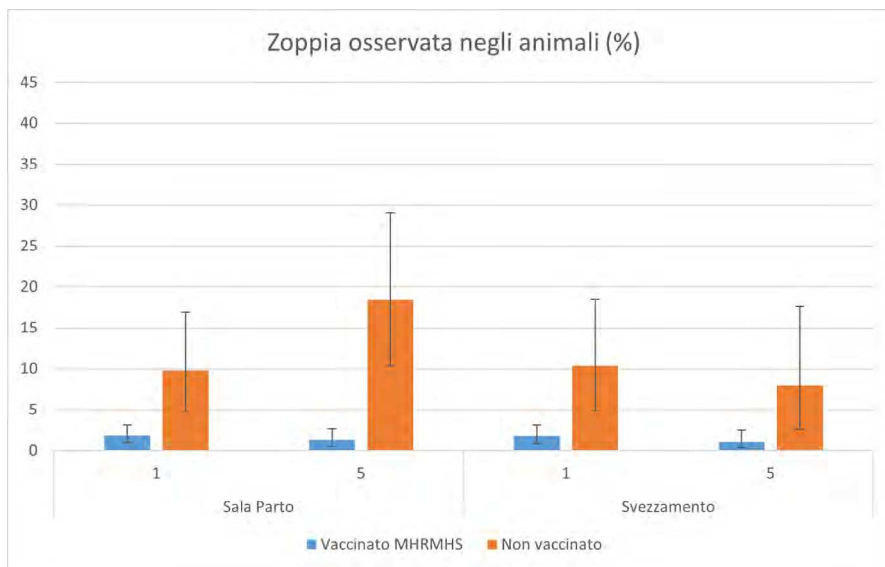
### Vaccino bivalente (MHR+MHS)

Nella prima banda considerata (banda 1), su 699 suinetti nati vivi, sono stati arruolati 607 soggetti nel gruppo vaccinato e 92 soggetti nel gruppo controllo (non vaccinato). In questa banda (Fig.1) è stato registrato un evidente miglioramento clinico nella fase sottoscrofa, con la riduzione significativa ( $p < 0,001$ ) della percentuale di zoppie nel gruppo vaccinato (1,81%) rispetto al gruppo controllo (9,78%).

Analogo andamento è stato osservato nella fase di svezzamento, dove vi è stata una significativa ( $p<0,001$ ) riduzione della percentuale di zoppie nel gruppo vaccinato (1,77%) rispetto al controllo (10,39%).

Nella seconda banda (banda 5), su 520 suinetti nati vivi, sono stati arruolati 455 soggetti nel gruppo vaccinato e 65 soggetti nel gruppo controllo.

Dal punto di vista clinico (Fig.1), in fase sottoscrofa, la percentuale di zoppie nel gruppo vaccinato è stata pari all'1,32% rispetto al 18,46% del gruppo controllo, con una riduzione significativa ( $p<0,001$ ) della sintomatologia osservata. Stesso andamento è stato osservato in fase svezzamento, dove nel gruppo vaccinato la percentuale di zoppie è stata dell'1,08%, rispetto all'8% rilevato nel gruppo controllo ( $p<0,01$ ).



**Figura 1.** Vaccino bivalente (MHR+MHS) - % di zoppie nei suini vaccinati e non vaccinati.  
**Figure 1.** Bivalent vaccine (MHR+MHS) - % of lameness in vaccinated and unvaccinated pigs.

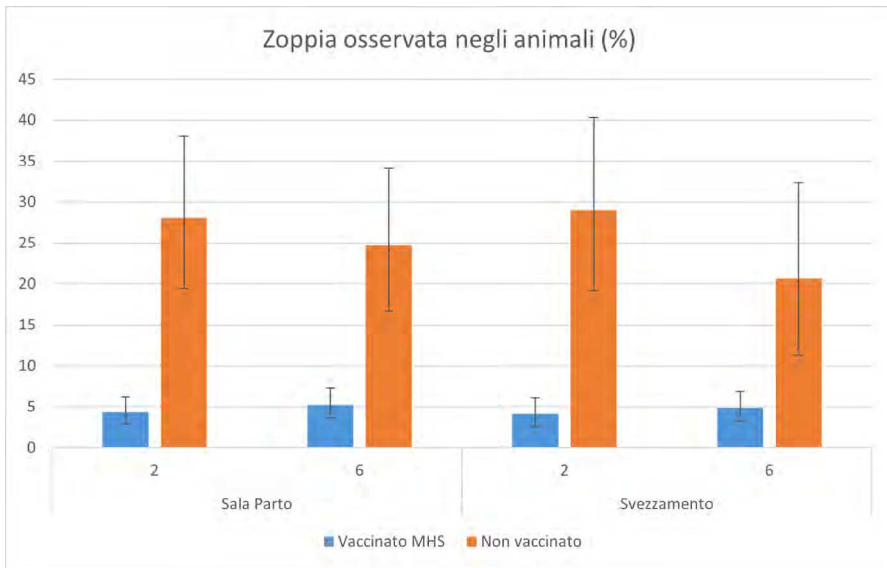
#### Vaccino monovalente nei confronti di MHS (vaccino MHS)

Nella prima banda (banda 2) considerata, su 664 suinetti nati vivi, sono stati arruolati 575 soggetti nel gruppo vaccinato e 89 soggetti nel gruppo controllo (non vaccinato).

È stato registrato un chiaro miglioramento della sintomatologia sia nella fase sottoscrofa (4,35% e 28,09% rispettivamente) che in fase di svezzamento (4,11% e 28,99% rispettivamente) con riduzioni significative ( $p<0,001$ ) della percentuale di zoppie nei gruppi vaccinati. (Fig.2).

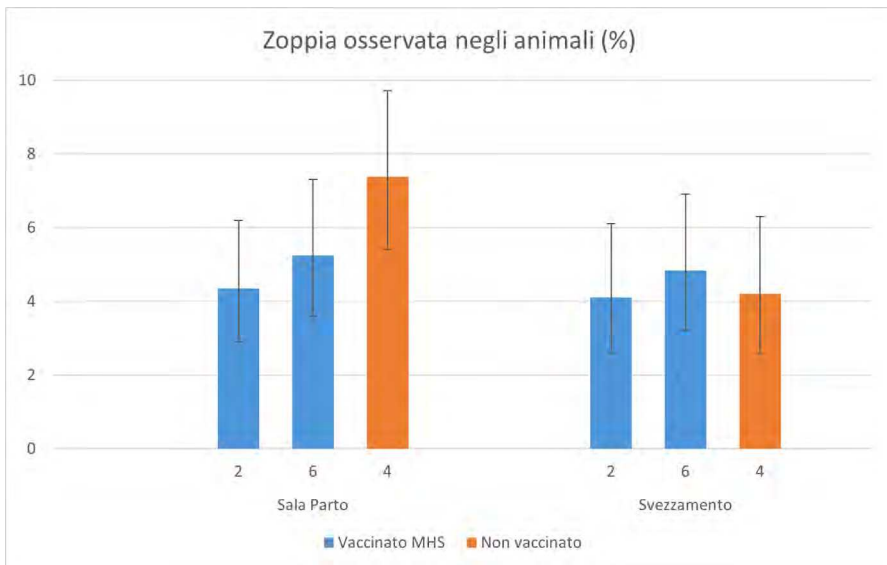
Nella seconda banda considerata (banda 6), su 666 suinetti nati vivi, sono stati arruolati 573 soggetti nel gruppo vaccinato e 93 soggetti nel gruppo controllo.

In fase sottoscrofa, la percentuale di zoppie nel gruppo vaccinato è stata pari all'5,24% rispetto al 24,73% del gruppo controllo, con una riduzione significativa ( $p<0,001$ ) della sintomatologia osservata. Il miglioramento della forma clinica è stato osservato anche in fase svezzamento, dove nel gruppo vaccinato la percentuale di zoppie è stata dell'4,84%, rispetto all'20,69% rilevato nel gruppo controllo ( $p<0,001$ ) (Fig.2).



**Figura 2.** Vaccino MHS - % di zoppie nei suini vaccinati e non vaccinati.  
**Figure 2.** MHS-Vaccine - % of lameness in vaccinated and unvaccinated pigs.

Confrontando i dati clinici osservati nelle bande vaccinate con il vaccino MHS (banda 2 e 6) con quelli della banda 4 non vaccinata emerge tuttavia una ridotta efficacia clinica di questo vaccino rispetto agli altri 2 oggetto di studio. Solo nei suinetti in sala parto della banda 2 infatti si osserva una riduzione significativa della percentuale di zoppie nei soggetti vaccinati ( $p < 0,05$ ) (Fig.3).



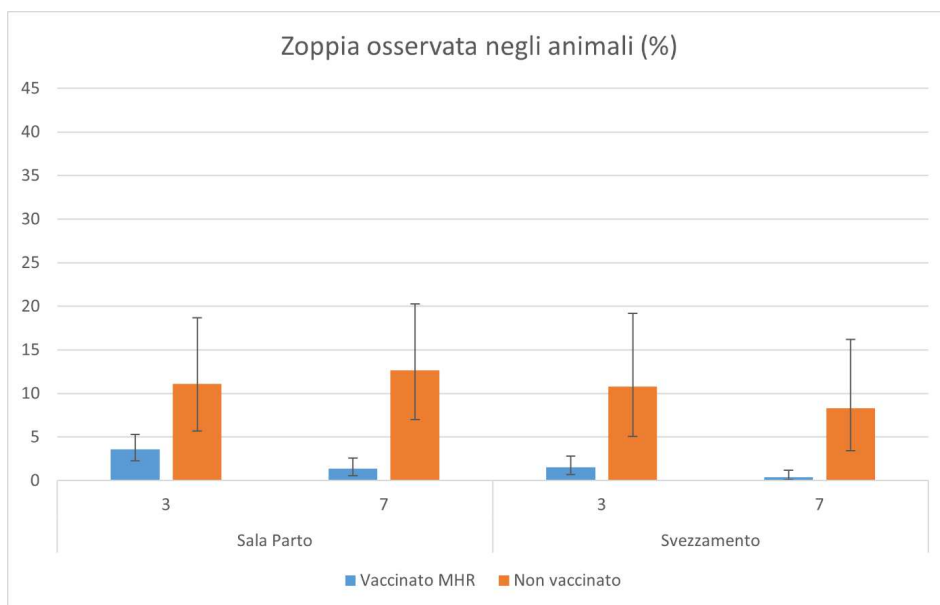
**Figura 3** Vaccino MHS – % di zoppie nei suini vaccinati (banda 2, 6) e non vaccinati (banda 4).  
**Figure 3.** MHS-Vaccine - % of lameness in vaccinated (batch 2, 6) and unvaccinated (batch 4) pigs.

### Vaccino monovalente nei confronti di MHR (vaccino MHR)

Nella prima banda (banda 3) considerata, su 700 suinetti nati vivi, sono stati arruolati 610 soggetti nel gruppo vaccinato e 90 soggetti nel gruppo controllo (non vaccinato).

La forma clinica osservata (Fig.4) è significativamente migliorata in fase sottoscrofa ( $p<0,01$ ) nel gruppo vaccinato (3,61% di zoppie osservate) rispetto al gruppo controllo (11,11%). Un andamento migliore è stato osservato anche nella fase di svezzamento, dove la percentuale di zoppie nel gruppo vaccinato è stata dell'1,52% rispetto al 10,81% del controllo ( $p<0,001$ ). Nella seconda banda (banda 7), su 669 suinetti nati vivi, sono stati arruolati 574 soggetti nel gruppo vaccinato e 95 soggetti nel gruppo controllo.

Anche in questo caso dal punto di vista clinico (Fig.4) i dati mostrano una riduzione significativa della sintomatologia nei suinetti sottoscrofa, dove la percentuale di zoppie nel gruppo vaccinato è stata pari all'1,39% rispetto al 12,63% del gruppo controllo ( $p<0,001$ ), che in fase svezzamento, dove nel gruppo vaccinato la percentuale di zoppie è stata dello 0,40%, rispetto all'8,33% rilevato nel gruppo controllo ( $p<0,001$ ).



**Figura 4.** Vaccino MHR - % di zoppie nei suini vaccinati e non vaccinati.

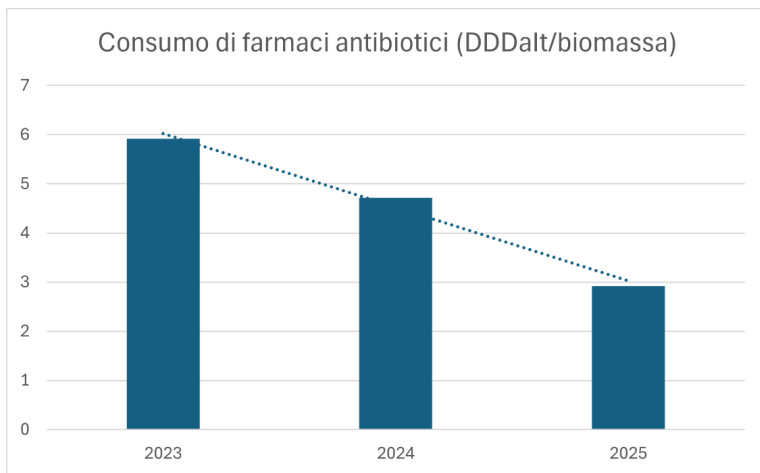
**Figure 4.** MHR-Vaccine - % of lameness in vaccinated and unvaccinated pigs.

### Valutazione consumo di farmaco

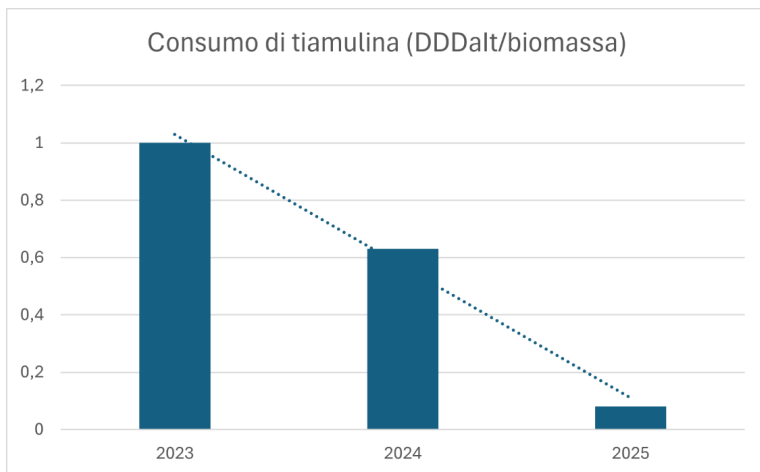
Dopo l'introduzione routinaria della vaccinazione con il vaccino stabulogeno bivalente (marzo 2025), è stato rilevato un netto miglioramento delle *performance* cliniche e produttive. È stato quindi valutato l'effetto della vaccinazione anche in termini di riduzione dell'utilizzo degli antibiotici.

Dall'analisi dei dati di consumo degli antibiotici sulla biomassa dell'allevamento dal 2023 al 2025 si evince un trend marcato e graduale di riduzione del consumo di farmaci antibiotici globale, da 5,93 a 4,73 a 2,92 DDDAit (Fig.5) rispettivamente per il 2023 (forma clinica),

2024 (trial vaccinali) e 2025 (routine vaccinale). Il trend di riduzione del consumo degli antibiotici si è verificato anche per quanto concerne la Tiamulina da 1 a 0,63 a 0,08 DDDAit (Fig.6) rispettivamente per il 2023, 2024 e 2025.



**Figura 5.** Trend consumo antibiotici espressi in DDDAit sulla biomassa dal 2023 al 2025  
**Figure 5.** Trend in antimicrobial use expressed in DDDAit per biomass from 2023 to 2025



**Figura 6.** Trend consumo Tiamulina espresso in DDDAit sulla biomassa dal 2023 al 2025  
**Figure 6.** Trend in Tiamulin consumption expressed in DDDAit per biomass from 2023 to 2025

## DISCUSSIONE

*Mycoplasma hyorhinis* (MHR) e *Mycoplasma hyosynoviae* (MHS) sono riconosciuti come importanti agenti eziologici coinvolti nelle forme artritiche del suino e risultano ampiamente diffusi nella popolazione suina mondiale. Entrambe le specie possono colonizzare gli animali in assenza di manifestazioni cliniche, comportandosi inizialmente come commensali del tratto respiratorio superiore o del distretto tonsillare. MHR colonizza prevalentemente

le alte vie respiratorie e, in condizioni predisponenti non ancora completamente chiarite, può disseminare per via sistemica determinando quadri di polisierosite e artrite, osservati soprattutto nei suinetti nel periodo post-svezzamento (Palzer et al., 2020).

Studi epidemiologici condotti nel Nord Italia (Salogni et al., 2022) hanno evidenziato come questo microrganismo rappresenti l'agente batterico più frequentemente associato a casi di poliartrite batterica in tale fase produttiva, con una percentuale di rilevamento pari al 61,7% dei soggetti analizzati.

Uno studio retrospettivo americano ha evidenziato un aumento significativo di diagnosi di polisierositi e artriti da MHR (Silva et al., 2023) nel periodo dal 2017 al 2022, sottolineando la rilevanza che questo microrganismo riveste nelle patologie della fase post-svezzamento.

Diversamente, MHS mostra un tropismo primario per il tessuto tonsillare, dove può persistere a lungo contribuendo alla presenza di animali portatori anche in età adulta. A partire da questo sito di colonizzazione, e attraverso meccanismi patogenetici tuttora non completamente noti, questo microrganismo può localizzarsi a livello articolare inducendo sinovite e artrite, generalmente riscontrate in suini in accrescimento di età superiore alle 10 settimane (Palzer et al., 2020).

Le conoscenze relative all'epidemiologia di MHS rimangono ancora limitate; nel contesto italiano, già Moronato et al. (2017) avevano descritto un episodio clinico severo caratterizzato da zoppia diffusa dovuta ad infezione da MHS in un allevamento suino a ciclo chiuso. In successive indagini epidemiologiche (Salogni et al., 2022), la frequenza di isolamento di MHS è risultata significativamente inferiore rispetto a MHR, con una percentuale di riscontro pari a circa il 3% dei casi esaminati. Anche Silva et al. (2023) hanno riscontrato un calo delle diagnosi di artrite da MHS, probabilmente anche dovuto ad un calo di richiesta diagnostica nella fase di magronaggio-ingrasso, dove la patologia da MHS si manifesta maggiormente, e dove può tuttavia essere più facilmente controllata tramite l'uso di antimicrobici.

Le strategie di controllo dei micoplasmi in generale si basano sul mantenimento di popolazioni *micoplasma-free*, sull'utilizzo di antimicrobici per mitigare le forme cliniche e sulla vaccinazione. Tuttavia, come già detto sopra, MHR e MHS sono microrganismi commensali e sono molto diffusi nella popolazione suina, dove persistono anche attraverso la presenza di portatori asintomatici ed eliminatori intermittenti. La strategia delle popolazioni *micoplasma-free*, utilizzata con successo in campo avicolo nel settore dei riproduttori ed attualmente in corso di implementazione nel settore suino in USA per ciò che riguarda *Mycoplasma hyopneumoniae*, appare pertanto difficilmente percorribile per questi microrganismi. L'utilizzo di antimicrobici, d'altro canto, richiede generalmente trattamenti prolungati per contenere le forme cliniche ma non risulta efficace nell'eliminazione di questi patogeni e può facilitare l'insorgenza di fenomeni di antimicrobico resistenza. Recenti studi su ceppi di MHR di origine europea hanno infatti evidenziato la presenza di ceppi con ridotta sensibilità ai chinoloni e ai macrolidi (Klein et al., 2022). La strategia vaccinale potrebbe essere quindi quella più efficace e diversi studi hanno già dimostrato l'efficacia di vaccini inattivati contro MHR nella stimolazione della risposta anticorpale, nella riduzione delle forme cliniche e nel miglioramento delle performance di crescita dei suini (Lee et al., 2018; Martinson et al., 2018; Wang et al., 2024). Alcuni studi hanno anche verificato l'utilizzo di vaccini combinati che includevano MHR insieme ad altri patogeni, quali *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Porcine Circovirus type 2* (Wei et al., 2020) dimostrando una efficacia promettente contro co-infezioni complesse. Altri recentissimi studi hanno esplorato l'efficacia di vaccini vivi attenuati nei confronti di MHR (Nagy et al., 2026). In Europa, tuttavia, non sono attualmente disponibili vaccini commerciali contro MHR. Per ciò che riguarda MHS, sia gli studi epidemiologici che la ricerca sui vaccini sono molto più limitati e non esistono vaccini approvati nei confronti di questo patogeno a livello mondiale. Scopo del nostro lavoro è stato quindi valutare l'efficacia

clinica di 3 vaccini stabulogeni, appositamente prodotti con l'autorizzazione del Ministero della Salute, a partire dai ceppi isolati in un focolaio di artrite da micoplasmi (Merenda et al., 2023).

I dati raccolti, prendendo in considerazione le differenze tra soggetti vaccinati e non vaccinati all'interno della stessa banda mostrano che tutte le valenze vaccinali (bivalente MHR+MHS, monovalente MHS, monovalente MHR), hanno permesso una riduzione significativa della percentuale di zoppie nei gruppi vaccinati. Confrontando invece le singole bande vaccinate con la banda non vaccinata si osserva che l'efficacia clinica del vaccino MHS risulta inferiore rispetto alle altre oggetto di studio. Questo è **presumibilmente** dovuto al diverso ruolo che MHR e MHS rivestivano nell'eziologia del caso clinico nell'azienda considerata. La patologia articolare segnalata dal veterinario aziendale riguardava infatti principalmente il settore svezzamento, con l'interessamento anche delle ultime fasi sottoscrofa e dell'inizio del magronaggio. L'isolamento di MHS è stato ottenuto dall'articolazioni di suini in magronaggio, coerentemente con l'epidemiologia di questo microrganismo, ma è **presumibile** che il ruolo di MHR nella eziologia artritica fosse, in questo caso specifico, preponderante tenuto conto dell'età della maggior parte dei soggetti colpiti.

Pur con i limiti metodologici tipici di una prova in campo, l'elevata numerosità del campione e l'ampio arco temporale dello studio garantiscono la significatività delle comparazioni intra ed inter-banda. Tali evidenze troveranno ulteriore conferma nel monitoraggio continuo dell'allevamento.

## CONCLUSIONI

Tutti i vaccini stabulogeni utilizzati nella prova di campo hanno dimostrato una efficacia clinica permettendo la riduzione delle forme cliniche articolari che impattavano notevolmente sul benessere degli animali, sul consumo di farmaco e sulla economicità dell'azienda in toto. In particolare, delle tre valenze vaccinali prodotte, il vaccino stabulogeno bivalente ha fornito notevoli benefici clinici ed è stato quindi scelto dalla proprietà, su indicazione del veterinario aziendale, per il proseguimento della routine vaccinale una volta terminata la prova descritta. A fronte dell'integrazione del piano vaccinale aziendale con il vaccino stabulogeno bivalente MHR+MHS si è osservata una marcata riduzione del consumo di antibiotici, in particolare delle pleuromutiline. I risultati di questo studio sottolineano il potenziale del vaccino stabulogeno come strumento strategico per controllare le patologie articolari promuovendo nel contempo una gestione delle problematiche infettive più consapevole e rispettosa degli obiettivi europei nella logica di riduzione dell'utilizzo degli antimicrobici ed inserita nel sistema *One Health*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Klein U, Földi D, Belec N, Hrivnák V, Somogyi Z, Gastaldelli M, Merenda M, Catania S, Dors A, Siesenop U, Vyt P, Kreizinger Z, Depondt W, Gyuranecz M. Antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from five European countries between 2019 and 2021. *PLoS One*. 2022 Aug 11;17(8)
2. Lee JA, Hwang MA, Han JH, Cho EH, Lee JB, Park SY, Song CS, Choi IS, Lee SW. Reduction of mycoplasmal lesions and clinical signs by vaccination against *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018 Feb;196:14-17. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.12.001. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29695319.
3. Martinson B, Zoghby W, Barrett K, Bryson L, Christmas R, Minion FC, Kroll J. Efficacy of an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs. *Vaccine*. 2018 Jan 8;36(3):408-412. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.063. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29221894.
4. Merenda M, Cornaggia M, Tondo A, Foiani G, Bottinelli M, Tonelli C, Mondin P, Vio

- D, Catania S. Artrite da *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma hyosynoviae* in suini con segni clinici di zoppia – indagini preliminari. Atti XLVIII Meeting Annuale SIPAS (2023) p.134.
5. Moronato, ML., Ustulin, M., Vio, D., Nicholas, RAJ., Catania, S. (2017) Diagnosis and control of a severe outbreak of lameness caused by *Mycoplasma hyosynoviae* in a closed pig unit. Veterinary Record Case Reports 5: e000500.
  6. Nagy EZ, Szeredi L, Földi D, Belec N, Kovács AB, Sulyok KM, Gróznér D, Wehmann E, Bányai K, Marton S, Tenk M, Kreizinger Z, Gyuranecz M. Development and efficacy test of a live, attenuated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine candidate strain. Vaccine. 2026 Mar 7;75:128278. doi: 10.1016/j.vaccine.2026.128278. Epub 2026 Jan 29. PMID: 41610462.
  7. Palzer A, Ritzmann M., Spersger J. (2020) *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in pig herds. In: Maes D., et al. eds. Mycoplasmas in swine. 1st edition, 248-265.
  8. Salogni C, Capucchio MT, Colombino E, Pozzi P, Pasquali P, Alborali GL. Bacterial polyarthritis in post-weaning pigs in a high-density swine breeding area in Italy. J Vet Diagn Invest. 2022 Jul;34(4):709-711.
  9. Silva APSP, Almeida M, Michael A, Rahe MC, Siepker C, Magstadt DR, Piñeyro P, Arruda BL, Macedo NR, Sahin O, Gauger PC, Krueger KM, Mugabi R, Streuslin JS, Trevisan G, Linhares DCL, Silva GS, Fano E, Main RG, Schwartz KJ, Burrough ER, Derscheid RJ, Sitthicharoenchai P, Clavijo MJ. Detection and disease diagnosis trends (2017-2022) for *Streptococcus suis*, *Glaesserella parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus suis* and *Mycoplasma hyosynoviae* at Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory. BMC Vet Res. 2023 Dec 12;19(1):268. doi: 10.1186/s12917-023-03807-w. PMID: 38087358; PMCID: PMC10714645.
  10. Wang J, Gan Y, Yuan T, Huang Y, Zhang L, Wei Y, Zubair M, Wang L, Chen J, Shao G, Feng Z, Xiong Q. Protection against *Mycoplasma hyorhinis* infection in commercial pigs via immunization with inactivated vaccines prepared with homologous or heterologous strains. Vaccine. 2024 Dec 2;42(26):126421. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.126421. Epub 2024 Oct 9. PMID: 39388932.
  11. Wei YW, Zhu HZ, Huang LP, Xia DL, Wu HL, Bian HQ, Feng L, Liu CM. Efficacy in pigs of a new inactivated vaccine combining *porcine circovirus type 2* and *Mycoplasma hyorhinis*. Vet Microbiol. 2020 Mar; 242:108588. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108588. Epub 2020 Jan 16. PMID: 32122592.

# ELEVATA PREVALENZA DI *MYCOPLASMA SUIS* IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE: STATO EMATOLOGICO ED ASSENZA DI TRASMISSIONE VETTORIALE

## **HIGH PREVALENCE OF *MYCOPLASMA SUIS* IN A SOW FARM: HEMATOLOGICAL STATUS AND EVIDENCE OF NO-VECTOR TRANSMISSION**

BORELLO I.<sup>1</sup>, MERENDA M.<sup>2</sup>, UGUZZONI M.<sup>3</sup>, TREVISI P.<sup>3</sup>, GOBBO F.<sup>2</sup>, GARZIERA T.<sup>2</sup>, SONCIN M.<sup>2</sup>, BERTAZZO V.<sup>2</sup>, SCOLLO A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze Veterinarie, Università di Torino;

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie IZSve;

<sup>3</sup>Dip. di Agricoltura e Scienze Alimentari (DISTAL), Università di Bologna.

**Parole chiave:** *Mycoplasma Suis*, scrofe, PCR

**Key words:** *Mycoplasma Suis*, sows, PCR

### **Riassunto**

*Mycoplasma suis* è un micoplasma emotropico del suino associato ad anemia infettiva e a forme cliniche spesso subcliniche ma potenzialmente rilevanti dal punto di vista produttivo. Tuttavia, i dati relativi alla sua diffusione e al suo impatto metabolico nelle scrofaie europee sono ancora limitati. Il presente studio ha avuto l'obiettivo di valutare la presenza di *M. suis* in una scrofaia italiana, descrivere i principali parametri ematologici delle scrofe infette e indagare il possibile ruolo degli insetti come vettori del patogeno.

Lo studio è stato condotto in un allevamento di 750 scrofe situato nel Nord Italia. Sono state campionate 237 scrofe. I campioni di sangue sono stati analizzati mediante PCR Real-Time per la rilevazione di *M. suis*, emocromo completo e determinazione della fruttosamina sierica. Parallelamente è stata effettuata una sorveglianza entomologica mediante trappole CDC-CO<sub>2</sub> per valutare la presenza di possibili vettori e la loro eventuale positività molecolare al patogeno.

Tutte le scrofe analizzate sono risultate positive a micoplasmi emotropici mediante PCR. La concentrazione media di emoglobina è risultata pari a 11,48 ± 1,04 g/dL; il livello medio di fruttosamina è stato di 282,10 ± 19,40 µmol/L. Gli insetti catturati sono risultati negativi. Dopo trattamento con ossitetraciclina nel mangime per 7 giorni, le scrofe campionate nel follow-up sono rimaste PCR-positive, ma hanno mostrato una riduzione significativa della fruttosamina (260,62 ± 15,12 µmol/L).

I risultati suggeriscono un'elevata diffusione di *M. suis* nell'allevamento studiato e indicano un possibile coinvolgimento del patogeno nelle alterazioni ematologiche e metaboliche osservate nelle scrofe. L'assenza di positività negli insetti catturati suggerisce un ruolo limitato dei vettori ambientali nella trasmissione dell'infezione nel contesto aziendale analizzato.

**Abstract:** *Mycoplasma suis* is a hemotropic mycoplasma of pigs associated with infectious anemia and often subclinical clinical forms that may nonetheless have relevant production impacts. However, data regarding its prevalence and metabolic impact in European sow herds remain limited. The aim of the present study was to assess the presence of *M. suis* in an Italian sow farm, describe the main hematological parameters of infected sows, and investigate the potential role of insects as vectors of the pathogen.

The study was conducted in a 750-sow farrow-to-wean farm located in Northern Italy. A total of 237 sows were sampled. Blood samples were analyzed using real-time PCR for the detection of *M. suis*, complete blood count, and serum fructosamine determination. In parallel, an entomological surveillance was carried out using CDC-CO $\square$  traps to assess the presence of potential vectors and their possible molecular positivity for the pathogen. All sampled sows tested positive for hemotropic mycoplasmas by PCR. The mean hemoglobin concentration was  $11.48 \pm 1.04$  g/dL, while the mean fructosamine level was  $282.10 \pm 19.40$   $\mu$ mol/L. All captured insects tested negative for *M. suis*. After treatment with oxytetracycline administered in feed for seven consecutive days, the sows sampled in the follow-up remained PCR-positive but showed a significant reduction in fructosamine levels ( $260.62 \pm 15.12$   $\mu$ mol/L).

These results suggest a high prevalence of *M. suis* infection in the studied herd and indicate a possible involvement of the pathogen in the hematological and metabolic alterations observed in sows. The absence of molecular positivity in the captured insects suggests a limited role of environmental vectors in the transmission of the infection in the investigated farm.

## INTRODUZIONE

*Mycoplasma suis* è un micoplasma emotrofico che aderisce alla superficie degli eritrociti, alterandone l'integrità di membrana e inducendo fenomeni di opsonizzazione e rimozione immunomediata da parte del sistema monocito-macrofagico, con conseguente anemia emolitica (Groebel et al., 2009). Il batterio è riconosciuto in tutto il mondo come causa di anemia infettiva e di ipoglicemia, spesso associate a performance ridotta e disturbi riproduttivi, con conseguenti perdite economiche. L'esposizione parenterale durante procedure zootecniche o attraverso combattimenti di ranghi rappresentano le principali vie epidemiologiche di trasmissione di *M. suis* (Stadler et al., 2021). Artropodi, come zanzare, mosche, pidocchi e zecche, sono stati segnalati come vettori di trasmissione per le specie *Eperythrozoon* (Song et al., 2012), e come fattore di rischio per lo stesso *M. suis* (Song et al., 2014; Arendt et al., 2025). La sindrome è caratterizzata da una forma acuta con febbre alta e anemia e da una forma cronica con segni clinici multipli e aspecifici che possono essere più o meno gravi a seconda della virulenza del ceppo e della suscettibilità dei suini (Stadler et al., 2021). Le scrofe colpite manifestano una clinica più accentuata solitamente prima del parto a causa dello stress, presentano anoressia per 1-3 giorni, febbre e possono presentare edema mammario e vulvare che provoca un flusso di latte ridotto e un inadeguato comportamento materno (Messick, 2004). La forma cronica della malattia causata da *M. suis* predomina, i segni aspecifici riducono le possibilità di formulare una diagnosi eziologica e possono portare ad anemia subclinica persistente (Ritzmann et al., 2009). L'anemia, definita da una riduzione della conta dei globuli rossi o da una bassa concentrazione di emoglobina nel sangue, è un indicatore di problemi di salute sottostanti che possono potenzialmente influire sulla salute e sulle prestazioni riproduttive delle scrofe. L'infezione da *M. suis*, sebbene principalmente associata ad anemia, nelle forme acute sperimentali è stata associata anche ad alterazioni metaboliche, tra cui ipoglicemia, verosimilmente correlate a stato infiammatorio sistemico, anoressia e aumentato consumo energetico. Con questo quadro, è essenziale che la diagnosi differenziale per *M. suis* includa condizioni come ulcere gastriche, carenza di ferro, leptospirosi, Circovirus suino di tipo 2 (PCV2) e virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV).

Lo sviluppo di metodi molecolari ha notevolmente facilitato l'identificazione dei patogeni. Oggi, l'analisi PCR è il metodo di scelta per la diagnosi delle infezioni da *M. suis* ed è stato introdotto un test PCR real-time sensibile e specifico per il suo rilevamento e la sua

quantificazione (Ritzmann et al., 2009). Le tetracicline sono il trattamento di scelta: né la somministrazione orale prolungata né quella parentale sono però sufficienti per ottenere l'eliminazione totale del batterio (Stadler et al., 2021). L'obiettivo dello studio è stato diagnosticare ed investigare la prevalenza di *M. suis* in un allevamento di scrofe italiano, descrivere i parametri ematologici associati all'infezione e la risposta a un programma di controllo. Inoltre, è stato valutato il possibile ruolo di insetti ematofagi tramite cattura ed analisi in PCR degli stessi.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un allevamento di 750 scrofe situato in provincia di Brescia. L'allevamento è positivo a *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2, negativo a PRRSV. Viene utilizzata una strategia di rimonta esterna, che prevede l'introduzione di scrofette PRRSV-negative. All'arrivo, gli animali vengono messi in quarantena e sottoposti a test sierologici per PRRSV e a un protocollo vaccinale (che include *M. hyopneumoniae*, PCV2 e PRRSV con un vaccino vivo modificato). Le scrofette vengono poi sottoposte a screening RT-PCR per il PRRSV per confermarne la negatività prima di essere introdotte in allevamento al momento della riproduzione. Inoltre le scrofe sono vaccinate durante la gestazione contro *E. Coli* e clostridiosi, con sostituzione dell'ago ogni dieci animali.

All'anamnesi, sono stati segnalati segni clinici ricorrenti nelle scrofe, tra cui mucose pallide, letargia, inappetenza, edema vulvare e mammario, e ipogalassia. Nei sei mesi precedenti il campionamento, le scrofe non erano state in grado di sostenere il periodo di lattazione (4 settimane) per l'intera nidata, rendendo necessario il trasferimento di una media di  $1,94 \pm 0,92$  suinetti per scrofa in adeguate *nurseries*. Indagini diagnostiche per PRRSV, PCV2 e *Leptospira spp.* avevano già prodotto risultati negativi. È stata quindi effettuata nelle scrofe un'indagine diagnostica per la ricerca di *M. suis*, includendo la valutazione dei principali parametri ematici degli animali, degli indicatori di anemia (concentrazione di emoglobina - HGB) e degli indicatori della glicemia media nelle settimane precedenti (fruttosamina - FRA).

Lo studio ha coinvolto 4 bande consecutive, da gennaio ad aprile 2025, per un totale di 237 scrofe con campionamento casuale stratificato per ordine di parto (ordine di parto 1-8). Al 110° giorno di gestazione, le scrofe sono state trasferite dalla sala gestazione alle gabbie parto fino allo svezzamento; durante tale giorno sono stati prelevati campioni di sangue da ciascuna scrofa, con accesso a livello giugulare e raccolti in provette da 4 mL con K-EDTA e provette senza anticoagulante da 4 mL (Vacutest Kima Srl). I campioni di sangue sono stati conservati a 4 °C fino all'invio al laboratorio diagnostico dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE). Per l'identificazione diretta di *M. suis* è stata eseguita una PCR Real-Time SYBR-Green su campioni di sangue raccolti in provette K3EDTA da un sottocampione di 50 scrofe selezionate casualmente, utilizzando i primer MYC 929 for e MYC 1192 rev, descritti da Willi et al. (2009). In seguito, i campioni positivi sono stati amplificati utilizzando i primer MYC F e MYC R, descritti da Ravagnan et al. (2017).

L'emocromo completo con conta differenziale dei leucociti è stato eseguito utilizzando l'analizzatore automatico XN 1000Vet (Sysmex Corporation, Kobe, Giappone) su campioni di sangue intero raccolti in provette con K3EDTA. L'analisi ha incluso: conta dei globuli rossi (RBC), emoglobina (HGB), ematocrito (HCT), volume corpuscolare medio (MCV), emoglobina corpuscolare media (MCH), concentrazione media di emoglobina corpuscolare (MCHC), ampiezza della distribuzione dei globuli rossi - coefficiente di variazione (RDW - CV) e globuli rossi nucleati (NRBC), conta dei globuli bianchi (WBC), linfociti (LYMPH), neutrofili (NEUT), eosinofili (EO), basofili (BASO) e monociti (MONO), conta piastrinica (PLT), e volume piastrinico medio (MPV). La determinazione

della fruttosamina (FRA) è stata invece effettuata su siero, ottenuto da sangue raccolto in provette prive di anticoagulanti e successivamente centrifugato a 3076 x g per 10 minuti a 20 °C. La concentrazione di FRA è stata quantificata utilizzando un analizzatore Cobas Pure e303 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) e kit diagnostici commerciali forniti da Roche Diagnostics. Il metodo analitico colorimetrico utilizzato ha previsto la reazione con Nitroblue Tetrazolio (NBT), con una sensibilità analitica di 14 µmol/L e un intervallo di linearità di 14-1000 µmol/L.

Al fine di valutare il ruolo degli insetti nella trasmissione di *M. suis*, è stata effettuata una sorveglianza entomologica, consistita in campionamenti effettuati a distanza di due settimane l'uno dall'altro, durante il mese di luglio 2025, utilizzando trappole tipo CDC-CO<sub>2</sub> (Centre for Disease Control and Prevention; Italian Mosquito Trap IMT®; PeP, Cantù, Italia). In ogni sessione, tre trappole sono state posizionate all'interno delle sale di gestazione e una nell'area di quarantena delle scrofette, mentre la quinta trappola è stata posizionata all'esterno della stalla. Ogni periodo di campionamento è durato 24 ore, per un totale di 10 campioni individuali. Questi, dopo la raccolta, sono stati conservati a 4°C durante la consegna al laboratorio dell'IZSVe. All'arrivo, gli artropodi raccolti sono stati contati e identificati allo stereomicroscopio. Lo screening molecolare per *M. suis* è stato eseguito su un sottocampione per identificare *M. suis*, utilizzando lo stesso metodo scelto per l'analisi dei campioni di sangue.

Tra i diversi parametri ematici è stato fatto un test di correlazione di Spearman, includendo anche l'ordine di parto.

A seguito dell'indagine, tutte le scrofe sono state trattate 3 settimane prima del parto con ossitetraciclina nel mangime per 7 giorni consecutivi (De Busser et al., 2008). Al termine del trattamento, 26 scrofe (OP 1-2) selezionate dalla banda in ingresso in sala parto sono state nuovamente prelevate (110° giorno di gestazione) per effettuare le analisi del sangue come descritto precedentemente.

## **RISULTATI**

Tutte le scrofe sono risultate essere positive in PCR a micoplasmi emotropici, mentre tutti i pool di insetti analizzati (100%) sono risultati negativi. La concentrazione emoglobinica media (HGB) è stata di  $11,476 \pm 1,043$  g/dL (min: 7,800; max: 14,100), con il 6,75% delle scrofe che ha mostrato livelli inferiori a 10,0 g/dL (soglia di anemia indicata da McClellan et al., 2024). Il livello medio di FRA è stato di  $282,101 \pm 19,399$  µmol/L (min: 233,000; max: 392,000) (Cools et al., 2010). I risultati degli altri parametri ematici sono riportati nella Tabella 1.

**Tabella 1.** Parametri ematologici delle scrofe (OP 1-8) positive a *Mycoplasma suis*. I dati sono espressi come valore minimo, valore massimo, media, deviazione standard. È stata effettuata un'analisi descrittiva utilizzando il software XLSTAT 2025.1.0.1427.

**Table 1.** Hematological parameters of *Mycoplasma suis*-positive sows (OP 1-8). Data are expressed as minimum, maximum, mean, and standard deviation. Descriptive statistical analysis was performed using XLSTAT software version 2025.1.0.1427.

Parametro	Valore minimo	Valore massimo	Media	Deviazione standard
WBC_K/ $\mu$ L	7,070	34,600	13,677	3,140
NEUT_K/ $\mu$ L	1,540	29,280	6,963	2,555
LYMPH_K/ $\mu$ L	1,840	14,130	5,024	1,704
MONO_K/ $\mu$ L	0,340	2,190	0,970	0,297
EO_K/ $\mu$ L	0,010	4,800	0,599	0,491
BASO_K/ $\mu$ L	0,010	0,810	0,114	0,078
NEUT%	16,500	84,700	50,905	11,473
LYMPH%	9,100	67,000	36,843	9,265
MONO%	3,100	17,100	7,123	1,719
EO%	0,100	30,200	4,279	3,180
BASO%	0,100	5,600	0,828	0,522
NRBC%	0,000	0,400	0,069	0,074
RBC_M/ $\mu$ L	1,100	7,410	5,683	0,785
HGB_g/dL	7,800	14,100	11,476	1,043
HCT%	9,000	46,000	36,435	3,816
MCV_fl	55,600	81,800	64,510	3,788
MCH_pg	17,200	73,600	20,507	3,713
MCHC_g/dL	28,700	90,000	31,714	3,886
RDW-CV%	14,100	23,200	17,731	1,761
PLT_K/ $\mu$ L	2,000	330,000	166,28	64,059
MPV_fl	7,100	13,200	11,306	0,819
NRBC_K/ $\mu$ L	0,000	0,100	0,009	0,011
FRA_μmol/L	233,000	392,000	282,10	19,399

La matrice di correlazione di Spearman ha rivelato diverse relazioni significative tra le variabili analizzate. È stata osservata una forte correlazione negativa tra l'ordine di parto (OP) e profilo eritrocitario, in particolare per quanto riguarda RBC ( $r = -0,752$ ;  $p < 0,0001$ ), HCT ( $r = -0,602$ ;  $p < 0,0001$ ) e HGB ( $r = -0,547$ ;  $p < 0,0001$ ). Al contrario, OP è risultato essere positivamente associato al MCV ( $r = 0,738$ ;  $p < 0,0001$ ) e a MCH ( $r = 0,735$ ;  $p < 0,0001$ ). Si sono osservate forti correlazioni positive tra HGB e RBC ( $r = 0,852$ ;  $p < 0,0001$ ) ed HCT ( $r = 0,951$ ;  $p < 0,0001$ ), così come per MCV e MCH ( $r = 0,943$ ;  $p < 0,0001$ ). I livelli di FRA hanno mostrato una significativa correlazione positiva con HGB ( $r = 0,225$ ;  $p = 0,001$ ).

L'attività di sorveglianza entomologica condotta durante il periodo estivo ha permesso di delineare un quadro dettagliato della presenza di potenziali vettori all'interno e all'esterno dell'allevamento. I dati raccolti evidenziano una maggiore presenza ambientale nelle aree esterne, dove sono stati censiti 45 esemplari di *Culex pipiens* e 4 di *Aedes caspius*, entrambe specie appartenenti alla famiglia *Culicidae* le cui femmine presentano comportamento ematofago. Al contrario, l'ambiente interno all'allevamento ha mostrato una densità di artropodi sensibilmente inferiore: 7 esemplari di *Coboldia fuscipes*, specie non ematofaga appartenente alla famiglia *Cecidomyiidae*, e un solo individuo di *Aedes caspius*.

### **Follow up**

Dopo il trattamento, la prevalenza di campioni positivi a *M. suis* è stata nuovamente del 100%. I risultati delle analisi relative ai parametri ematici sono riportati nella Tabella 2, confrontati con i parametri ematici di 122 scrofe di ordine di parto 1-2 prima del trattamento. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante test di Mann-Whitney per campioni indipendenti. La HGB media complessiva delle scrofe dopo il trattamento è stata di  $12,10 \pm 0,60$  g/dL e FRA  $260,62 \pm 15,12$   $\mu\text{mol/L}$ .

**Tabella 2.** Parametri ematologici prima e dopo il trattamento nelle scrofe (OP 1-2) positive a *Mycoplasma suis*. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD). Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante test di Mann–Whitney per campioni indipendenti. Il livello di significatività statistica è stato fissato a  $p < 0,05$ .

**Table 2.** Hematological parameters before and after treatment in *Mycoplasma suis*-positive sows (OP 1-2). Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Differences between groups were evaluated using the Mann–Whitney U test for independent samples. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

Parametro	Prima del trattamento (media $\pm$ SD)	Dopo il trattamento (media $\pm$ SD)	p-value
WBC (K/ $\mu$ L)	14.36 $\pm$ 2.47	14.91 $\pm$ 3.32	0.626
NEUT (K/ $\mu$ L)	6.47 $\pm$ 1.74	7.08 $\pm$ 2.50	0.344
LYMPH (K/ $\mu$ L)	6.11 $\pm$ 1.67	5.90 $\pm$ 1.21	0.518
MONO (K/ $\mu$ L)	1.04 $\pm$ 0.28	1.08 $\pm$ 0.26	0.610
EO (K/ $\mu$ L)	0.58 $\pm$ 0.37	0.73 $\pm$ 0.38	0.069
BASO (K/ $\mu$ L)	0.15 $\pm$ 0.10	0.14 $\pm$ 0.05	0.446
NEUT (%)	45.25 $\pm$ 10.24	46.74 $\pm$ 8.64	0.345
LYMPH (%)	42.53 $\pm$ 8.30	40.08 $\pm$ 6.44	0.093
MONO (%)	7.23 $\pm$ 1.46	7.26 $\pm$ 1.03	0.497
EO (%)	3.98 $\pm$ 2.29	4.99 $\pm$ 2.56	0.050
BASO (%)	1.01 $\pm$ 0.67	0.94 $\pm$ 0.34	0.997
NRBC (%)	0.07 $\pm$ 0.07	0.07 $\pm$ 0.05	0.720
RBC (M/ $\mu$ L)	6.22 $\pm$ 0.59	6.35 $\pm$ 0.44	0.319
HGB (g/dL)	12.00 $\pm$ 0.99	12.10 $\pm$ 0.60	0.719
HCT (%)	38.48 $\pm$ 3.24	38.03 $\pm$ 1.87	0.340
MCV (fL)	61.96 $\pm$ 2.75	60.03 $\pm$ 2.74	<b>0.001</b>
MCH (pg)	19.33 $\pm$ 0.91	19.11 $\pm$ 1.03	0.192
MCHC (g/dL)	31.20 $\pm$ 0.72	31.84 $\pm$ 0.74	<b>0.001</b>
RDW-CV (%)	18.20 $\pm$ 1.49	18.41 $\pm$ 0.77	0.328
PLT (K/ $\mu$ L)	176.34 $\pm$ 51.75	159.15 $\pm$ 47.83	0.139
MPV (fL)	11.13 $\pm$ 0.66	10.92 $\pm$ 0.56	0.162
NRBC (K/ $\mu$ L)	0.01 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.02	0.206
FRA ( $\mu$ mol/L)	283.28 $\pm$ 17.73	260.62 $\pm$ 15.12	<b>&lt;0.001</b>

## DISCUSSIONE

Nel presente studio, tutte le scrofe campionate (100%) sono risultate positive in PCR a micoplasmi emotropici. Nella letteratura recente (Brissonnier et al., 2020), la frequenza di infezione nelle scrofe gestanti varia ampiamente tra allevamenti, ma raramente raggiunge il 100%: ad esempio, in 10 allevamenti commerciali francesi la prevalenza intra-allevamento è risultata essere compresa tra 5% e 95%, e nessun allevamento era completamente negativo. Il nostro dato si colloca quindi all'estremo superiore di quanto riportato in contesti europei, compatibile con una circolazione intensa e stabile del patogeno e/o con condizioni gestionali che favoriscono la disseminazione ematica. Nonostante *Mycoplasma suis* sia riconosciuto a livello internazionale come agente di anemia infettiva suina, la produzione scientifica italiana specificamente dedicata a questo micoplasma è estremamente scarsa. Gran parte delle pubblicazioni italiane su micoplasmi nei suini si concentra su specie diverse, come *Mycoplasma hyopneumoniae* o *Mycoplasma hyorhinitis*, oppure su condizioni più ampiamente studiate (es. complessi multifattoriali di patologie respiratorie), senza fornire dati epidemiologici solidi o studi di prevalenza per *M. suis* nel contesto italiano. Nel recente panorama epidemiologico italiano, emergono solo riferimenti generali alla presenza di micoplasmi nel comparto suino senza una quantificazione sistematica di *M. suis*, e la letteratura disponibile non include lavori con disegni di sorveglianza strutturati né indagini multiregionali dedicate a questo patogeno. Analogamente, nelle pubblicazioni veterinario-cliniche italiane la discussione su *M. suis* rimane principalmente descrittiva o manualistica piuttosto che basata su dati originali di campo, evidenziando una lacuna conoscitiva.

Nell'analisi dei parametri ematologici, particolare attenzione è stata rivolta ai livelli di emoglobina e fruttosamina sierica – biomarcatore dello stato glicemico in medicina umana e veterinaria, i cui livelli sono indicativi del livello medio di glucosio nel sangue nelle 2-3 settimane precedenti. In studi recenti, la soglia anemica comunemente adottata è  $\leq 10$  g/dL (McClellan et al., 2024). Tuttavia, il profilo ematologico delle scrofe mostra che, nonostante una certa percentuale di animali (6,75%) presenti valori di HGB inferiori a 10,0 g/dL, l'HGB media complessiva ( $11,476 \pm 1,043$  g/dL) rimane abbastanza vicina ai valori riportati in letteratura per animali nello stesso periodo riproduttivo (11.6-12.6 g/dL; Ježek et al., 2017; Thorn, 2010). Ciò è in contrasto con quanto atteso, poiché studi su *M. suis* hanno rivelato livelli di emoglobina più bassi (Ritzmann et al., 2009), suggerendo un adattamento fisiologico che previene l'anemia grave in presenza di infezione cronica. Le forti correlazioni positive tra HGB, RBC ( $r = 0,852$ ;  $p < 0,0001$ ) e HCT ( $r = 0,951$ ;  $p < 0,0001$ ) indicano che le scrofe mantengono la massa eritrocitaria nonostante l'infezione, un segno tipico della risposta adattativa che bilancia la trattenuta di ferro con il mantenimento della capacità di trasporto di ossigeno. Inoltre, la modesta associazione positiva tra FRA e HGB ( $r = 0,225$ ;  $p = 0,001$ ) suggerisce che il miglioramento delle riserve proteiche e dello stato metabolico può supportare l'eritropoiesi, mitigando ulteriormente l'impatto dell'infezione cronica. L'influenza di OP sul profilo ematologico ha rivelato numerose correlazioni significative: secondo ricerche precedenti (McClellan et al., 2024), un OP più elevato è correlato a valori inferiori di RBC ( $r = -0,752$ ;  $p < 0,0001$ ), HCT ( $r = -0,602$ ;  $p < 0,0001$ ) e HGB ( $r = -0,547$ ;  $p < 0,0001$ ), ma a valori più elevati di MCV ( $r = 0,738$ ;  $p < 0,0001$ ) e MCH ( $r = 0,735$ ;  $p < 0,0001$ ), riflettendo uno spostamento verso eritrociti più grandi e più ricchi di emoglobina in grado di compensare la riduzione del numero di cellule. Sebbene il declino possa essere in parte attribuito alla difficoltà fisiologica di ripristinare i livelli ematici dopo il parto, è plausibile che l'infezione cronica da *M. suis* esacerbi queste carenze. La risposta macrocitica osservata in questo studio riflette un meccanismo compensatorio tipico delle anemie emolitiche rigenerative. Come descritto da Groebel et

al. (2009) nelle infezioni da *M. suis*, il midollo osseo risponde alla distruzione indotta dal parassita rilasciando reticolociti, eritrociti immaturi più grandi, nel flusso sanguigno. Questo adattamento fisiologico è fondamentale per il mantenimento di un adeguato apporto di ossigeno; sebbene la conta eritrocitaria totale sia ridotta, la macrocitosi ottimizza la capacità di ossigenazione dei tessuti in condizioni di infezione cronica. Sebbene in letteratura variazioni simili di MCV e MCH siano state osservate nelle scrofe più anziane, indipendentemente dallo stato di infezione, la mancanza di dati di prevalenza in tali studi limita il confronto diretto.

Per quanto riguarda i marcatori metabolici, il valore medio sierico di FRA prima del trattamento con ossitetraciclina era di  $282,101 \pm 19,399$   $\mu\text{mol/L}$ , superiore ai  $247 \pm 19$   $\mu\text{mol/L}$  riportati da Cools et al. (2010). Sebbene la letteratura associ *Mycoplasma suis* a episodi di ipoglicemia nelle forme acute di malattia, tale quadro riguarda prevalentemente infezioni cliniche severe. Al contrario, nel contesto della presente indagine, condotta su scrofe naturalmente infette, la maggiore fruttosamina osservata prima del trattamento potrebbe riflettere un'alterazione metabolica sistemica legata all'infezione cronica/subclinica e allo stato infiammatorio associato, più che un diretto effetto ipoglicemizzante del patogeno.

In seguito alla somministrazione del trattamento antibiotico, era attesa una riduzione della prevalenza di *M. suis*; tuttavia, tale riscontro non ha trovato conferma sperimentale, in linea con quanto già evidenziato in precedenti studi (Stadler et al., 2021). La fruttosamina ha tuttavia mostrato una riduzione significativa dopo il trattamento ( $p < 0,001$ ), suggerendo una modulazione dello stato metabolico sistemico associato all'infezione. La fruttosamina rappresenta un indicatore della glicazione non enzimatica delle proteine sieriche e riflette l'andamento medio della glicemia nelle settimane precedenti. L'infezione da *Mycoplasma suis*, anche in forma subclinica, è stata associata a risposta infiammatoria sistemica e possibili alterazioni del metabolismo glucidico e ossidativo. La riduzione osservata dopo il trattamento potrebbe quindi riflettere una diminuzione dello stress infiammatorio e metabolico correlato alla presenza del patogeno. La concomitante variazione significativa degli indici eritrocitari (MCV e MCHC) supporta l'ipotesi di una modulazione del turnover eritrocitario, fenomeno che potrebbe contribuire indirettamente alle modificazioni dei livelli di fruttosamina.

Le evidenze disponibili indicano che la trasmissione di *M. suis* avviene in modo efficiente attraverso il trasferimento di sangue infetto, in particolare mediante procedure iatrogene/gestionali (aghi riutilizzati, strumenti contaminati, manipolazioni) e, in misura variabile, attraverso lesioni da contatto (es. lotte di rango) che possono comportare microemorragie. Dinamica che si sospetta anche nell'allevamento oggetto dello studio. A tal proposito, sembra essere non coinvolta la via del vettore ematofago. Nonostante le catture siano state effettuate nella stagione estiva — periodo in cui la letteratura scientifica (Song et al., 2014) riporta una prevalenza di *Mycoplasma suis* significativamente più elevata rispetto al resto dell'anno a causa di condizioni di umidità e temperatura favorevoli allo sviluppo dei vettori — lo screening molecolare condotto sugli insetti catturati ha dato esito negativo per la presenza del patogeno. Tale riscontro appare in parziale contrasto con le ipotesi di studi precedenti (Arendt et al., 2025), che indicano gli artropodi ematofagi come potenziali responsabili della trasmissione di *M. suis*. Tuttavia, tra le specie riscontrate all'interno dell'allevamento, gli emafagi non erano rappresentati se non da un unico individuo, confermando l'assenza di coinvolgimento nel caso clinico di questi vettori ma non escludendo a priori un ruolo degli ematofagi in altre condizioni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arendt M., Hoelzle K., Stadler J., Ritzmann M., Ade J., Hoelzle L.E., Schwarz L. (2025) "Occurrence and Quantification of Porcine Hemotrophic Mycoplasmas in Blood-Sucking *Stomoxys calcitrans*". *Microorganisms* 13,1607.
2. Brissonnier M., Normand V., Lebret A., Moalic P.Y., Guyomard A.S., Bachy V., Berton P., Auvigne V., Bouchet F., Boulbria, G. (2020). "Frequency of infection with *Mycoplasma suis* in gestating sows using qPCR on ten commercial French herds, and impact of the infection on clinical, haematological and biochemical parameters". *Porcine Health Management* 6, 13.
3. Cools A., Maes D., Buyse J., Kalmar I.D., Vandermeiren J.-A., Janssens G.P.J. (2010) "Effect of N,N-dimethylglycine supplementation in parturition feed for sows on metabolism, nutrient digestibility and reproductive performance". *Animal* 4, 2004–2011.
4. De Busser E.V., Mateusen B., Vicca J., Hoelzle L., Haesebrouck F., Maes D. (2008). "Mycoplasma suis infection in suckling pigs on a Belgian farm". *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 77, 182–186.
5. Groebel K., Hoelzle K., Wittenbrink M.M., Ziegler U., Hoelzle L.E. (2009) "Mycoplasma suis Invades Porcine Erythrocytes". *Infect Immun* 77, 576-584.
6. Ježek J., Starič J., Nemeč M., Plut J., Oven I.G., Klinkon M., Štukelj M. (2017) "On pig hematological profiles. *Journal of Swine Health and Production*", 26(2).
7. McClellan K.A., Lindemann M.D., Levesque C.L. (2024) "Assessment of hemoglobin concentration in sows and their offspring over consecutive reproductive cycles". *Journal of Swine Health and Production* 32, 248–257.
8. Messick J.B. (2004). "Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential". *Veterinary Clinical Pathology* 33, 2–13.
9. Ravagnan S., Carli E., Piseddu E., Da Rold G., Porcellato E., Zanardello C., Carminato A., Vascellari M., Capelli G. (2017) "Prevalence and molecular characterization of canine and feline hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in northern Italy". *Parasites Vectors* 10, 132.
10. Ritzmann M., Grimm J., Heinritzi K., Hoelzle K., Hoelzle L.E. (2009). "Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings". *Veterinary Microbiology* 133, 84–91.
11. Song Q., Wang L., Fang R., Khan M.K., Zhou Y., Zhao J. (2012). "Detection of *Mycoplasma wenyonii* in cattle and transmission vectors by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay". *Trop Anim Health Prod* 45, 247–250.
12. Song Q., Zhang W., Song W., Liu Z., Khan M.K., He L., Fang R., Li P., Zhou Y., Hu M., Zhao J. (2014) "Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China". *Prev Vet Med.* 117, 215-21.
13. Stadler J., Ade J., Hermanns W., Ritzmann M., Wentzel S., Hoelzle K., Hoelzle L.E. (2021) "Clinical, haematological and pathomorphological findings in *Mycoplasma suis* infected pigs". *BMC Veterinary Research* 17, 214.
14. Thorn C.E. (2000) "Normal hematology of the pig" *Schalm's Veterinary Hematology*, 5, 1089–1095.
15. Willi B., Meli M.L., Lüthy R, Honegger H., Wengi N., Hoelzle L.E., Reusch C.E., Lutz H., Hofmann-Lehmann R. (2009) "Development and Application of a Universal Hemoplasma Screening Assay Based on the SYBR Green PCR Principle". *J Clin Microbiol.* 47, 4049-4054.

# MIOCARDITE GRANULOMATOSA ASSOCIATA A INFEZIONE DA PCV2 NEL SUINO

## ***GRANULOMATOUS MYOCARDITIS RELATED TO PCV2 INFECTION IN A GROWING PIG***

D'ANNUNZIO G.<sup>1</sup>, CORDIOLI B.<sup>1</sup>, DE LORENZI G.<sup>1</sup>, BONGIOVANNI E.<sup>2</sup>,  
ARIOLI E.<sup>3</sup>, PROSPERI A.<sup>1</sup>, TORREGGIANI C.<sup>1</sup>, CHIAPPONI C.<sup>1</sup>, PUPILLO G.<sup>1</sup>,  
BASSI P.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup>*Veterinario libero professionista*

<sup>3</sup>*Veterinario Gruppo Martini Spa*

**Parole chiave:** PCV2, istopatologia, immunistochimica

**Key Words:** PCV2, histopathology, immunohistochemistry

### **Riassunto**

Il Circovirus suino di tipo 2 (PCV2) è responsabile di un ampio spettro di manifestazioni clinicopatologiche che interessano prevalentemente i tessuti linfoidi, con un possibile coinvolgimento multiorgano. In questo *case report* viene descritto un caso di miocardite granulomatosa associata a infezione da PCV2 in un magrone di 60kg, rinvenuto morto, proveniente da un gruppo di animali all'ingrasso precedentemente colpiti e trattati per malattia respiratoria. All'esame necroscopico il cuore presentava aree multifocali biancastre di consistenza aumentata corrispondenti istologicamente ad una miocardite granulomatosa, caratterizzata da infiltrati infiammatori multifocali confluenti, costituiti principalmente da macrofagi, cellule epitelioidi, cellule giganti multinucleate, linfociti e sparsi eosinofili, associati a degenerazione e necrosi delle fibre miocardiche. L'indagine immunistochimica ha dimostrato l'associazione delle lesioni con l'infezione da PCV2, confermandone la causalità, rilevando l'antigene virale nel citoplasma dei macrofagi presenti nel contesto della lesione granulomatosa. Il caso descritto documenta come PCV2 possa essere coinvolto nello sviluppo di lesioni cardiache atipiche e sottolinea l'importanza di includere tale agente eziologico nella diagnosi differenziale delle miocarditi granulomatose nel suino.

### **Abstract**

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is associated with a broad spectrum of clinicopathological conditions primarily affecting lymphoid tissues, although multisystemic involvement may occur. This report describes a case of granulomatous myocarditis associated with PCV2 infection in a grower pig found dead, originating from a finishing farm with a recent history of respiratory disease. At necropsy, the heart showed multifocal, firm, whitish areas within the myocardium. Histopathological examination revealed granulomatous myocarditis characterized by multifocal to coalescing inflammatory infiltrates composed mainly of macrophages, epithelioid cells, multinucleated giant cells, lymphocytes and scattered eosinophils, associated with degeneration and necrosis of myocardial fibers. Immunohistochemical analysis demonstrated PCV2 antigen within the cytoplasm of macrophages, confirming the etiological association between viral infection and the observed lesions. This case highlights the potential role of PCV2 in the pathogenesis of atypical cardiac lesions and underscores the importance of including PCV2 in the differential diagnosis of granulomatous myocarditis in swine.

## INTRODUZIONE

Il *Porcine Circovirus type 2* (PCV2) è un piccolo virus a DNA circolare appartenente alla famiglia delle *Circoviridae*, riconosciuto come agente causale di un ampio spettro di condizioni patologiche nel suino, note come *porcine circovirus-associated diseases* (PCVAD). Con l'avvento della vaccinazione, la forma più diffusa di malattia da PCV2 è oggi quella di infezione subclinica; viceversa, solo in una frazione minore di animali l'infezione porta allo sviluppo di malattie cliniche evidenti, spesso associate alla presenza di co-infezioni e/o condizioni stressanti concomitanti responsabili di una compromissione del sistema immunitario. I quadri clinico-patologici descritti in letteratura includono la *PCV2-systemic disease* (PCV2-SD), la *porcine dermatitis and nephropathy syndrome* (PDNS), le forme riproduttive (*PCV2-reproductive disease*, PCV2-RD), le forme respiratorie (*PCV2-lung disease*, PCV2-LD) e quelle enteriche (*PCV2-enteric disease*, PCV2-ED) (Gillespie et al., 2009; Segalés, 2012; Segalés and Sibila, 2022; Maity et al., 2023). Le lesioni caratteristiche dell'infezione sistemica da PCV2 includono deplezione linfoide, con riduzione di linfociti B e T sostituiti da infiltrati di macrofagi, cellule epitelioidi e cellule giganti multinucleate, con possibile formazione di granulomi nei tessuti linfoidi e presenza dell'antigene virale nel contesto delle lesioni (Gillespie et al., 2009; Segalés, 2012). A livello polmonare, l'infezione è associata a polmonite interstiziale granulomatosa, bronchiolite necrotizzante e fibrosi, con antigene virale rilevabile nei macrofagi alveolari mediante immunostochimica (IHC) o ibridazione in situ (ISH) (Segalés, 2012; Sarli et al., 2021). Nei casi di PDNS, si osservano vasculiti necrotizzanti con necrosi fibrinoide dei piccoli vasi e corrispondenti lesioni cutanee necrotico-emorragiche in associazione a nefropatia con glomerulonefrite fibrino-necrotizzante (Segalés, 2012). Nelle forme enteriche si osserva deplezione linfoide a livello di placche del Peyer ed enterite linfoplasmacellulare/granulomatosa (Segalés, 2012; D'Annunzio et al., 2023). Nelle forme riproduttive le manifestazioni cliniche tipiche comprendono: aborto, natimortalità, mummificazione fetale e aumento della mortalità pre-svezzamento (West et al., 1999; Opriessnig et al., 2007; Mikami et al., 2005).

Sebbene il coinvolgimento cardiaco non sia tra i quadri più comuni di PCVAD, PCV2 può contribuire allo sviluppo di forme cardiache nei suini, ampliando lo spettro delle lesioni sistemiche associate a questa infezione. Studi sperimentali e *case reports* presenti in letteratura documentano infatti il coinvolgimento del sistema cardiovascolare in corso di infezione da PCV2, con lo sviluppo di miocardite non suppurativa caratterizzata da infiltrati di cellule mononucleate e degenerazione necrotica delle fibre miocardiche associata a positività per l'antigene virale nei cardiomiociti e nelle cellule infiammatorie (Mikami et al., 2005; Opriessnig et al., 2006), tipicamente osservata in feti e/o in suinetti nei primi giorni di vita.

Alla luce dell'ampio spettro di lesioni associato all'infezione da PCV2, il riscontro di localizzazioni atipiche assume particolare rilevanza diagnostica e patogenetica. Sebbene le lesioni classiche interessino prevalentemente il tessuto linfoide e l'apparato respiratorio, la dimostrazione di infiltrati infiammatori granulomatosi in organi diversi da quelli linfoidi evidenzia la capacità del virus di diffondersi e replicare in diversi distretti tissutali. In questo contesto, il coinvolgimento cardiaco rappresenta una manifestazione rara ma plausibile, sostenuta da precedenti segnalazioni. Il caso qui riportato di miocardite granulomatosa associata ad infezione da PCV2 in un suino magrone si inserisce in tale quadro, contribuendo ad ampliare le conoscenze sulle manifestazioni patologiche non convenzionali dell'infezione, sottolineando l'importanza di includere PCV2 nella diagnosi differenziale delle miocarditi nel suino.

## MATERIALI E METODI

Il caso descritto riguarda un magrone di circa 60 kg, proveniente da un ingrasso (sito 3) della provincia di Reggio Emilia che ospita circa 1100 capi, provenienti da una scrofaia in cui si esegue routinariamente la vaccinazione nei confronti di *Mycoplasma hyopneumoniae*

e PCV2. Al momento dell'accasamento (inizio novembre 2025), tutti i soggetti sono stati vaccinati nei confronti del virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV). Ciò nonostante, durante i mesi di novembre e dicembre la comparsa di sintomi respiratori con tosse persistente nel gruppo hanno richiesto terapia farmacologica. Infatti, nel mese di novembre i soggetti con sintomi clinici sono stati trattati con florfenicolo e antinfiammatorio (cortisonico) somministrati intramuscolo, ed il mese successivo il gruppo è stato alimentato con mangime medicato con tiamulina. A metà dicembre un soggetto trovato morto è stato conferito presso il laboratorio IZSLER-sezione diagnostica di Reggio Emilia perché fosse sottoposto ad opportune indagini diagnostiche. Nei giorni precedenti il conferimento non vi era stata evidenza di segni clinici, né di mortalità anomala, che si attestava intorno all'1%. In corso di esame necroscopico, sono stati raccolti campioni destinati ad analisi batteriologiche, biomolecolari ed istopatologiche.

#### *Analisi batteriologiche e biomolecolari*

L'esame batteriologico è stato eseguito da polmone, fegato, milza e rene. Il materiale biologico è stato prelevato sterilmente e seminato su piastre di agar sangue (5% sangue di montone, BA) e Gassner agar (GA, selettivo per *Enterobacteriaceae*) incubate per 24-48 ore a 37°C in aerobiosi.

Porzioni di miocardio sono state testate in Real Time RT-PCR per la ricerca del virus dell'Encefalomiocardite (ECMV) (metodo *home made* IZSLER) e successivamente ai risultati dell'esame istologico tale campione è stato analizzato con Real-Time PCR quantitativa per la ricerca e quantificazione di PCV2 (metodo *home made* IZSLER).

#### *Esame istopatologico ed immunoistochimico*

Campioni di tessuto quali rene, polmone, milza, cuore e ileo sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, processati di *routine* per l'esame istopatologico ed inclusi in blocchetti di paraffina. Sono quindi stati allestiti vetrini con sezioni di 3 micron di spessore colorati con colorazione ematossilina eosina (EE) secondo procedure standard. Sezioni di cuore sono state sottoposte ad esame immunoistochimico per PCV2. In breve, le sezioni sono state deparaffinate e reidratate; il blocco delle perossidasi endogene è stata eseguito con perossido al 3% in metanolo per 30 minuti. Lo smascheramento antigenico è stato effettuato utilizzando proteasi di tipo XIV allo 0,5% in soluzione salina tamponata con Tris (TBS) per 20 minuti a 37°C. Dopo il lavaggio, il blocco dei legami aspecifici è stato eseguito per 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di albumina sierica bovina al 3% in PBS-Tween 20. Sulle sezioni è stato quindi applicato un anticorpo monoclonale primario per PCV-2 (Ingenasa, 36A9) seguito da incubazione overnight a 4°C. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario, le sezioni sono state risciacquate tre volte in PBS, a cui ha fatto seguito un'incubazione di 30 minuti con Scytek CRF Anti-Polyvalent HRP Polymer e dall'applicazione del substrato finale della perossidasi, preparato secondo le istruzioni del produttore [CRF Anti-Polyvalent HRP Polymer (DAB) Stain Kit, ScyTek Laboratories, CPH080].

I vetrini sono stati infine controcolorati con ematossilina di Papanicolaou (Histo-Line Laboratories) e coperti con coprivetrini utilizzando il montante Bio Mount (Bio-Optica, 05-BMHM100). Come controllo positivo di reazione sono stati impiegati campioni di tessuto risultati positivi alla PCR per PCV2. La reazione IHC è stata considerata positiva in caso di colorazione marrone del citoplasma di macrofagi, cellule giganti e monociti.

## **RISULTATI**

### *Esame anatomopatologico*

La carcassa non presentava lesioni apprezzabili all'esame esterno. A livello toracico, i lobi

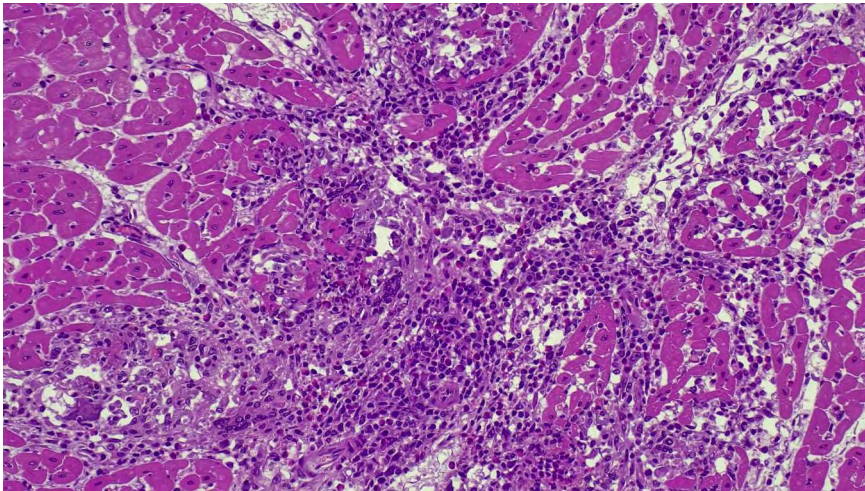
medi polmonari si presentavano consolidati. A livello cardiaco, si osservava pericardite fibrinosa e presenza di lesioni biancastre multifocali confluenti, apprezzabili a livello di epicardio e miocardio ventricolare (destra e sinistra). In cavità addominale era presente abbondante versamento sieroso-ematico con filamenti di fibrina. Lo stomaco conteneva scarse quantità di alimento e sia il piccolo intestino che il fegato si presentavano fortemente congesti.

#### *Analisi batteriologiche e biomolecolari*

L'esame batteriologico e l'esame virologico per la rilevazione dell'ECMV hanno dato esito negativo. La Real-Time PCR con *target* nei confronti di PCV2 è risultata positiva ( $1.1 \times 10^5$  copie di genoma virale/grammo di tessuto).

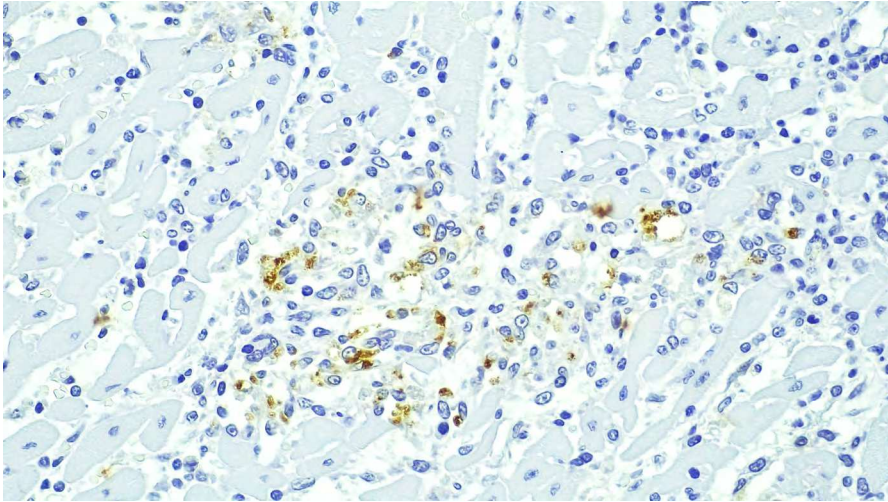
#### *Esame istopatologico ed immunohistochimico*

All'esame istologico, il rene era caratterizzato da iperemia diffusa e necrosi e degenerazione tubulare acuta. Nel polmone, accanto alla marcata iperplasia del tessuto linfoide associato ai bronchi (BALT), si osservava edema polmonare diffuso e presenza di emorragie polmonari multifocali. La milza appariva gravemente congesta. A livello cardiaco, il miocardio appariva infiltrato da aggregati multifocali confluenti di numerosi macrofagi frammentati a linfociti, cellule epitelioidee, occasionali cellule giganti multinucleate, linfociti e sparsi eosinofili (miocardite granulomatosa) (Figura 1). Contestualmente all'infiammazione di tipo granulomatoso, i miocardiociti apparivano multifocalmente necrotici, caratterizzati da ipereosinofilia e da perdita della normale striatura trasversale. L'esame IHC ha evidenziato la presenza dell'antigene virale associato agli infiltrati infiammatori presenti a livello cardiaco (Figura 2).



**Figura 1.** Miocardio, ematossilina eosina. Il miocardio appare infiltrato da aggregati multifocali coalescenti di numerosi macrofagi, cellule epitelioidee, rari linfociti, sparsi eosinofili e occasionali cellule giganti multinucleate, con necrosi delle fibre miocardiche. Si osservano piccoli foci di mineralizzazione. 200x.

**Figure 1.** Myocardium, hematoxylin eosin. The myocardium is infiltrated by multifocal coalescing aggregates of numerous macrophages mixed with epithelioid cells, rare lymphocytes, scattered eosinophils and multinucleated giant cells. Necrosis of myocardial fibers associated with mineralization are detected. Magnification 200x.



**Figura 2.** Miocardio, immunistoichimica per PCV2. Reazione positiva all'antigene di PCV2 con colorazione marrone del citoplasma di macrofagi nel contesto della lesione di miocardite granulomatosa. 400x.

**Figure 2.** Myocardium, immunohistochemistry for PCV2-antigen. Positive, cytoplasmic, immunolabeling of macrophages within granulomatous inflammation of myocardium. Magnification 400x.

## DISCUSSIONE

Il *Porcine Circovirus type 2* (PCV2) è noto per indurre lesioni prevalentemente a carico del tessuto linfoide, caratterizzate da deplezione linfocitaria e infiammazione di tipo granulomatoso, considerate *hallmark* istopatologiche della PCV2-SD. Tuttavia, la capacità del virus di replicare in macrofagi, cellule dendritiche e cellule endoteliali (Yu et al., 2007; Szeredi et al., 2012), associata alla dimostrazione della presenza di antigeni virali in sedi extra-linfoidi, suggerisce il potenziale tropismo sistemico del virus, ampliando lo spettro delle manifestazioni patologiche associate all'infezione da PCV2. Il caso presentato in questo lavoro evidenzia un coinvolgimento cardiaco atipico, rappresentato da una miocardite granulomatosa in un suino magrone, lesione raramente descritta in corso di PCVAD. Lesioni cardiache come la miocardite sono infatti per lo più descritte in feti abortiti per infezione intrauterina (West et al., 1999), o in suinetti disvitali di pochi giorni di età (Mikami et al., 2005), suggerendo che il miocardio in sviluppo possa costituire un tessuto particolarmente suscettibile. In questo caso invece la miocardite granulomatosa potrebbe rappresentare il risultato di una persistenza virale e attivazione cronica della risposta macrofagica e linfocitaria, coerentemente con il meccanismo immunopatologico tipico delle infezioni da PCV2, in cui la risposta immunitaria inefficace contribuisce al mantenimento dell'infezione (Meng et al., 2013).

Dal punto di vista diagnostico, l'evidenza di lesioni cardiache e di miocardite nel suino impone una diagnosi differenziale con altre eziologie infettive, tra cui EMCV, parvovirus suino in ambito fetale e neonatale, e agenti batterici (ad es. *Streptococcus suis*). Tuttavia, a differenza delle forme virali cardiotropiche classiche, nelle quali predominano necrosi miocardica e lesioni più diffuse, in questo caso la presenza di un infiltrato granulomatoso con positività immunistoichimica per PCV2 all'interno delle cellule infiammatorie rappresenta un elemento distintivo rilevante. Conformemente al protocollo diagnostico dopo l'osservazione

di lesioni necrotiche a livello di miocardio in corso di esame necroscopico, è stato condotto con esito negativo l'esame per la ricerca del genoma di EMCV. La dimostrazione della positività in PCR per PCV2, unitamente alla rilevazione mediante immunoistochimica dell'antigene PCV2 all'interno delle cellule infiammatorie, supporta, in definitiva, l'ipotesi del ruolo diretto del virus nella patogenesi della lesione.

È noto che le co-infezioni con agenti batterici e/o virali, come in caso di contemporanea infezione per esempio con PRRSV, parvovirus suino, virus influenzali o della malattia di Aujeszky (Opriessnig and Halbur, 2012; Ouyang et al., 2019; D'Annunzio et al., 2023), contribuiscono ad aggravare le lesioni indotte da PCV2. In modelli sperimentali, la co-infezione con *Streptococcus suis* sierotipo 2 ha contribuito, grazie alla disregolazione del sistema immunitario, ad aumentare la patogenicità, causando un'esacerbazione dell'infiammazione e maggiore gravità delle lesioni polmonari, articolari e anche cardiache (Wang et al., 2020). Nei casi di campo, inclusi quelli descritti in suinetti neonati e feti abortiti, non sono state invece identificate infezioni concomitanti direttamente collegate alle lesioni miocardiche descritte, così come anche in questo caso le indagini diagnostiche collaterali, comprese quelle batteriologiche, hanno prodotto un risultato negativo. Questo suggerisce che PCV2 possa agire, almeno in alcuni casi, come agente eziologico primario della miocardite. Il riscontro di una miocardite granulomatosa amplia ulteriormente il concetto di PCV2 come patogeno sistemico, capace di determinare risposte infiammatorie croniche anche in organi non convenzionalmente considerati bersaglio dell'infezione. L'elevata prevalenza di infezione subclinica da PCV2 nei suini allevati rende plausibile che manifestazioni rare, come la miocardite granulomatosa, possano essere sottostimate o non sistematicamente investigate. In questo contesto, l'inclusione routinaria del cuore nel campionamento istologico in casi sospetti di PCVAD potrebbe contribuire ad una migliore definizione dell'effettiva frequenza di tale localizzazione.

## CONCLUSIONI

Il caso descritto documenta una miocardite granulomatosa associata a infezione da PCV2 nel suino, confermando la possibilità di localizzazioni cardiache atipiche nell'ambito delle PCV-associated diseases. La presenza di antigeni virali intralesionali e l'assenza di coinfezioni rafforzano l'ipotesi di un coinvolgimento diretto di PCV2 nella patogenesi della lesione miocardica. Questo reperto sottolinea l'importanza di includere PCV2 nella diagnosi differenziale delle miocarditi infiammatorie del suino e di considerare indagini virologiche mirate anche in presenza di quadri patologici non convenzionali.

## BIBLIOGRAFIA

1. D'Annunzio, G., Ostanello, F., Muscatello, L. V., Orioles, M., Bacci, B., Jacumin, N., Leotti, G., Tommasini, N., Alborali, G. L., Luppi, A., Vio, D., Mandrioli, L., & Sarli, G. (2023). Porcine Lawsonia intracellularis Ileitis in Italy and Its Association with Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Infection. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(7), 1170.
2. D'Annunzio, G., Ostanello, F., Muscatello, L. V., Orioles, M., Jacumin, N., Tommasini, N., Leotti, G., Luppi, A., Mandrioli, L., & Sarli, G. (2023). Porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus alone or associated are frequent intralesional detected viruses in porcine respiratory disease complex cases in Northern Italy. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1234779.
3. Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X. J., Pelzer, K., & Buechner-Maxwell, V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(6), 1151–1163.

4. Maity, H. K., Samanta, K., Deb, R., & Gupta, V. K. (2023). Revisiting Porcine Circovirus Infection: Recent Insights and Its Significance in the Piggery Sector. *Vaccines*, 11(8), 1308.
5. Meng X. J. (2013). Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annual review of animal biosciences*, 1, 43–64.
6. Mikami, O., Nakajima, H., Kawashima, K., Yoshii, M., & Nakajima, Y. (2005). Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *The Journal of veterinary medical science*, 67(7), 735–738.
7. Opriessnig, T., & Halbur, P. G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus research*, 164(1-2), 20–32.
8. Opriessnig, T., Janke, B. H., & Halbur, P. G. (2006). Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. *Journal of comparative pathology*, 134(1), 105–110.
9. Opriessnig, T., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 19(6), 591–615.
10. Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., & Ren, L. (2019). Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses*, 11(2), 185.
11. Sarli, G., D'Annunzio, G., Gobbo, F., Benazzi, C., & Ostanello, F. (2021). The Role of Pathology in the Diagnosis of Swine Respiratory Disease. *Veterinary sciences*, 8(11), 256.
12. Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus research*, 164(1-2), 10–19.
13. Segalés, J., & Sibila, M. (2022). Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Veterinary sciences*, 9(3), 110.
14. Szeredi, L., Dán, A., Solymosi, N., Cságola, A., & Tuboly, T. (2012). Association of porcine circovirus type 2 with vascular lesions in porcine pneumonia. *Veterinary pathology*, 49(2), 264–270.
15. Wang, Q., Zhou, H., Hao, Q., Li, M., Liu, J., & Fan, H. (2020). Coinfection with porcine circovirus type 2 and *Streptococcus suis* serotype 2 enhances pathogenicity by dysregulation of the immune responses in piglets. *Veterinary microbiology*, 243, 108653.
16. West, K. H., Bystrom, J. M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G. M., Haines, D. M., Clark, E. G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., & Ellis, J. A. (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 11(6), 530–532.
17. Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P. G., & Thacker, E. (2007). Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 115(3-4), 261–272.

# **POSTER**

# SUPPLEMENTAZIONE A BREVE TERMINE CON BETA-1,3-GLUCANO MIGLIORA LA QUALITÀ DEL COLOSTRO IN SCROFE IPERPROLIFICHE

SANTOS T.<sup>1</sup>, SOTO-SALANOVA M.F.<sup>2</sup>, CASIRO S.<sup>2</sup>, MATTUZZI S.<sup>2</sup>, ROXO A.<sup>1</sup>, JOAQUIM M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Suinimoura - Agro-Pecuária Lda, Rua da Mata, N° 200, Casais da Bidoeira 2415-004 Bidoeira de Cima*

<sup>2</sup>*Animal Nutrition and Health, Kemin Europa N.V., Toekomstlaan 42, 2200 Herentals, Belgio*

<sup>3</sup>*D.I.N. Desenvolvimento e Inovação Nutricional S.A., Zona Industrial da Catraia, Apartado 50, 3441-909 Santa Comba Dão, Portogallo*

## BACKGROUND & OBIETTIVI

La qualità del colostro è essenziale per la sopravvivenza e lo sviluppo precoce del suinnetto. I beta-1,3-glicani (BG1,3) sono riconosciuti per le loro proprietà immunomodulanti e per il potenziale miglioramento della composizione del colostro. La loro supplementazione ha mostrato benefici quando fornita dal giorno 85 di gestazione, ma strategie così prolungate risultano poco pratiche nei sistemi commerciali. Questo studio mirava a valutare se una supplementazione a breve termine di BG1,3 durante l'ultima settimana prima del parto potesse migliorare la qualità del colostro, offrendo un'alternativa economicamente sostenibile.

## MATERIALI E METODI

È stata condotta una prova in un allevamento commerciale in Portogallo con 88 scrofe iperprolifiche TN 70, tutte di terza parità. Gli animali sono stati assegnati a un gruppo controllo (n=42) o a un gruppo trattato (n=46) che ha ricevuto BG1,3 (Aleta™, Kemin Industries) a 300 g/t per otto giorni nella dieta di transizione. I campioni di colostro sono stati raccolti dalla prima coppia di capezzoli e analizzati tramite rifrattometria Brix. Il colostro è stato successivamente classificato in due gruppi in base al momento del parto: 0–3 ore e oltre 12 ore. Le differenze nei valori Brix sono state valutate con ANOVA a una via utilizzando il software R.

## RISULTATI

Le scrofe trattate nel gruppo 0–3 ore (n=19) hanno mostrato valori Brix significativamente superiori (28,59) rispetto al controllo (n=16, 25,35), con un incremento di 3,24° (p < 0,001). Nel gruppo oltre 12 ore, i valori Brix delle scrofe trattate (n=25) sono risultati in media 23,63 rispetto ai 21,10 del controllo (n=22), con un miglioramento di 2,53° (p = 0,013).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La supplementazione a breve termine di BG1,3 durante l'ultima settimana di gestazione ha migliorato significativamente la qualità del colostro in entrambi i gruppi di parto osservati, indicando una risposta fisiologica rapida e sostenuta. Nel gruppo trattato, il 75% delle scrofe valutate tra 0 e 3 ore dal parto ha mostrato una qualità del colostro superiore rispetto al 5% migliore del gruppo di controllo. Oltre il 25% delle scrofe trattate con BG1,3 ha raggiunto valori superiori a 30°, considerati colostro di ottima qualità secondo la scala proposta da Hasan et al. (2016), mentre più del 25% delle scrofe del gruppo controllo ha registrato valori inferiori a 24°, classificati come borderline.

L'integrazione mirata di BG1,3 nelle diete di transizione rappresenta una strategia efficace e facilmente replicabile per la moderna produzione suinicola.

#### **BIBLIOGRAFIA**

S.M.K. Hasan, S. Junnikkala, A. Valros, O. Peltoniemi, C. Oliviero, Validation of Brix refractometer to estimate colostrum immunoglobulin G content and composition in the sow, *Animal*, Volume 10, Issue 10, 2016, Pages 1728-1733, ISSN 1751-7311, <https://doi.org/10.1017/S1751731116000896>.

# VALUTAZIONE DELL'IMMUNOGLOBULINA G DEL COLOSTRO IN UN ALLEVAMENTO COMMERCIALE DI SCROFE: DIFFERENZE IN BASE AL PARTO E RUOLO DEL BETA-1,3-GLUCANO COME IMMUNOADIUVANTE

MATTUZZI S.<sup>1</sup>, GARRIDO I.A.<sup>1</sup>, NETO R.<sup>1</sup>, CASIRO S.<sup>1</sup>, KIRWAN S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Kemin Europa, Toekomstlaan 42, 2200 Herentals, Belgio*

## BACKGROUND E OBIETTIVI

Con l'aumento del numero di suinetti nati e una quantità di colostro prodotta pressoché invariata, l'interesse verso la qualità del colostro è cresciuto significativamente. Questo esperimento aveva l'obiettivo di valutare le differenze nel colostro tra diverse parità e di esplorare opzioni per incrementare il contenuto di immunoglobuline.

## MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate quarantasette scrofette e scrofe provenienti da un allevamento commerciale da 1.200 scrofe nella Repubblica Ceca, caratterizzata da genetica iperprolifica e negativo per PRRS e *M. hyopneumoniae*. Il gruppo è stato suddiviso in controllo (n=25) e trattamento (n=22). Il gruppo trattamento ha ricevuto 1 g/scrofa/giorno di un immunoadiuvante (beta-1,3-glucano) dal giorno 85 di gestazione fino alla fine della lattazione. Entrambi i gruppi presentavano una distribuzione uniforme delle parità. Il colostro è stato raccolto seguendo una procedura standardizzata. Il contenuto di immunoglobuline è stato misurato mediante test ELISA e curva di calibrazione.

## RISULTATI

Nel gruppo di controllo, le scrofe al 6° parto hanno mostrato il livello più basso di Immunoglobulina G (IgG), pari a 51,82 mg/ml, seguite dalle scrofette con 59,12 mg/ml. Le scrofe di 2° parto hanno mostrato un aumento a 94,58 mg/ml, con un picco nella 3° parto a 101,8 mg/ml, seguito da un calo progressivo.

L'immunoadiuvante ha avuto un impatto positivo sui livelli di IgG in tutti i parti. Le scrofe al 6° parto hanno comunque mostrato il livello più basso (94,2 mg/ml). Le scrofette hanno più che raddoppiato i loro livelli di IgG rispetto al controllo (136,15 mg/ml), mentre le scrofe di 2° parto sono aumentate a 132,55 mg/ml. Nel gruppo trattamento il picco è stato osservato nelle scrofe osservate al 3° parto (165,61 mg/ml), prima di diminuire.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli immunoadiuvanti hanno mostrato un aumento numerico positivo dei livelli di IgG in tutti i parti, con i risultati più rilevanti nei primi tre parti, che rappresentano circa il 60% della scrofaia. Inoltre, il gruppo di controllo ha sottolineato l'importanza di mantenere una buona distribuzione dei parti eliminando le scrofe con 6 o più parti. Questo studio su piccola scala ha fornito differenze numeriche e funge da prova dell'efficacia del concetto, pertanto dovrà essere ampliato con una sperimentazione su scala più ampia.

# POLMONITI GRANULOMATOSE DA CORPI ESTRANEI VEGETALI NEI SUINI AL MACELLO

## GRANULOMATOUS PNEUMONIA DUE TO PLANT-DERIVED FOREIGN BODIES IN SLAUGHTER PIGS

ROMANO A.<sup>1</sup>, BAGHINI S.<sup>1</sup>, DI BENEDETTO F.<sup>1</sup>, PICCIONI M.A.<sup>2</sup>, ROSAMILIA A.<sup>3</sup>, CIABATTONI U.<sup>2</sup>, OLIVASTRI A.<sup>2</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Teramo;

<sup>2</sup>AST Ascoli Piceno Marche - Dipartimento di Prevenzione - Servizio Igiene degli Alimenti di Origine Animale;

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia-Romagna, sezione di Bologna.

**Parole chiave:** suino, polmonite granulomatosa, caratteristiche microscopiche

**Key words:** swine, granulomatous pneumonia, microscopic features

### Riassunto

In questo contributo si riportano le principali caratteristiche morfologiche della polmonite granulomatosa da corpi estranei vegetali, recentemente osservata in 5 suini regolarmente macellati e con lesioni macroscopiche riferibili a polmonite enzootica. I granulomi coinvolgevano sia i bronchioli sia i sacchi alveolari, erano costituiti prevalentemente da cellule giganti multinucleate e talvolta includevano frammenti vegetali ben visibili. La loro osservazione in un'unica partita di suini avvalorava l'importanza dei fattori ambientali predisponenti (polverosità dell'aria), in presenza dei quali la prevalenza di granulomi da corpo estraneo può essere piuttosto elevata.

### Summary

*We report herein the main morphological features of granulomatous pneumonia caused by plant foreign bodies, recently observed in 5 slaughtered pigs and showing gross lesions consistent with enzootic pneumonia. The granulomas involved both bronchioles and alveolar sacs, they mainly consisted of multinucleated giant cells and occasionally included visible plant fragments. Their observation within a single batch of pigs supports the importance of predisposing environmental factors (airborne dust), which could increase the prevalence of foreign body granulomas.*

### INTRODUZIONE

Il complesso delle malattie respiratorie del suino ("Porcine Respiratory Disease Complex", PRDC) è una sindrome multifattoriale che colpisce soprattutto gli animali in fase di accrescimento-ingrasso, con notevole impatto sul loro stato di salute, sulla produttività aziendale e sul consumo di antimicrobici. Il PRDC è la risultante di complesse interazioni fra microrganismi patogeni, fattori manageriali e caratteristiche intrinseche dell'ospite. Pertanto, l'approccio diagnostico al PRDC è un esercizio piuttosto articolato e deve basarsi sulla valutazione critica di dati anamnestici, clinici, anatomo-patologici e laboratoristici (Zimmerman *et al.*, 2019).

Per prassi consolidata, si tende a dare priorità alle indagini microbiologiche (esami batteriologici tradizionali e test biomolecolari) che hanno indiscutibilmente molti vantaggi: a) gli esami batteriologici consentono di dimostrare la presenza di un determinato patogeno e di apprezzarne la sensibilità/resistenza agli antimicrobici; b) i test biomolecolari sono estremamente sensibili e specifici, piuttosto rapidi e possono fornire dati epidemiologicamente rilevanti. Per contro, la dimostrazione di un agente patogeno non ha necessariamente significato diagnostico, se non si accompagna alla presenza di rilievi clinici e patologici specifici. A tal proposito, è emblematico il caso delle sindromi clinico-patologiche associate all'infezione da PCV2 (Segalés *et al.*, 2025).

Le indagini istopatologiche sono economiche e potenzialmente molto utili per emettere o sostenere una diagnosi solida. Tuttavia, la loro esecuzione non è routinaria nella maggior parte dei laboratori diagnostici, probabilmente a causa dei tempi necessari per processare i campioni (72 h nella migliore delle ipotesi).

Si riportano di seguito alcuni rilievi istopatologici, d'interesse diagnostico e incidentalmente osservati in suini regolarmente macellati.

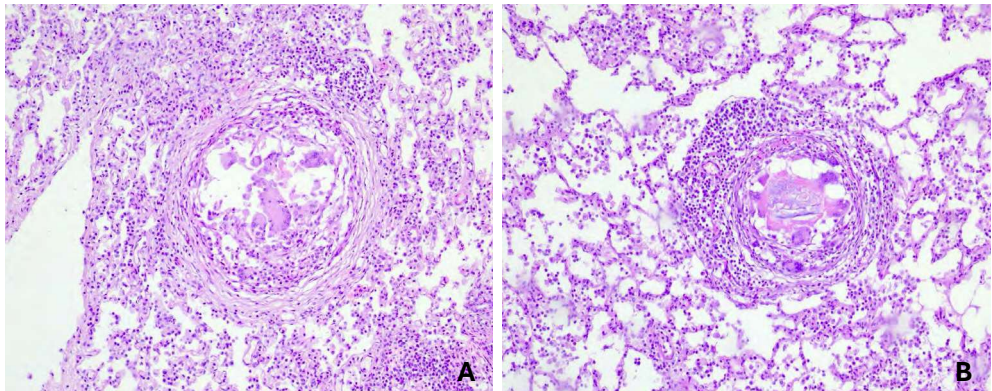
## MATERIALI E METODI

In totale, sono stati oggetto di studio 143 suini pesanti italiani, con lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica e campionati in 8 giornate di macellazione, nel periodo compreso fra il 15 settembre 2025 ed il 15 dicembre 2025. Da ciascun suino sono stati prelevati campioni tissutali rappresentativi. Questi ultimi sono stati immediatamente fissati in formalina neutra tamponata al 10% e successivamente processati come di *routine* per le indagini istopatologiche del caso (colorazione mediante ematossilina-eosina). Ove necessario sono stati, inoltre, eseguiti approfondimenti istochimici mediante metodica PAS (Bio-Optica).

## RISULTATI

Nella stragrande maggioranza dei casi, le lesioni microscopiche erano ampiamente compatibili con il sospetto di polmonite enzootica: marcata iperplasia del BALT, polmonite bronchiolo-interstiziale, presenza di essudato all'interno di bronchi, bronchioli e sacchi alveolari (costituito in prevalenza da macrofagi e neutrofilo), occasionalmente pleurite subacuto-cronica.

In 5 suini, tutti campionati durante la stessa giornata di macellazione e appartenenti alla stessa partita (80 suini, 18 dei quali con lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica), sono state osservate contestualmente lesioni a carattere granulomatoso, fino ad un massimo di 5 per sezione di tessuto. I granulomi erano ricchi di cellule giganti multinucleate di tipo *Müller* e *Langhans*, coinvolgendo sia i bronchioli che i sacchi alveolari. A livello bronchiolare, la reazione granulomatosa ostruiva il lume ed era spesso associata alla presenza di frammenti vegetali, ben visibili nelle sezioni colorate in ematossilina-eosina e intensamente PAS-positivi. I granulomi presenti in sede alveolare erano delimitati da una capsula fibrotica ben sviluppata, in assenza di corpi estranei; tuttavia, la presenza di materiale PAS-positivo era pure visibile nel citoplasma di alcune cellule giganti (Fig. 1).



**Figura 1.** Polmone. (A) Il lume di un bronchiolo è pressoché totalmente occupato da cellule giganti multinucleate. (B) La reazione granulomatosa circonda un piccolo frammento vegetale. Colorazione mediante ematossilina-eosina (ingrandimento finale x200).

**Figure 1.** Lung. (A) The lumen of a bronchiole is almost completely filled by multinucleated giant cells. (B) Granulomatous reaction surrounding a small remnant of plant material. Hematoxylin and eosin staining (final magnification  $\times 200$ ).

## DISCUSSIONE

L'inalazione di corpi estranei di origine vegetale è comunemente associata alla comparsa di granulomi ed è stata descritta in molte specie animali (Zachary, 2017). In particolare, Corner e Jericho (1972) hanno pubblicato un'ampia casistica in suini infettati sperimentalmente con micoplasmi.

Le lesioni oggetto di questo contributo sono pienamente sovrapponibili a quanto riportato in letteratura e stimolano alcune riflessioni. Innanzitutto, lo studio conferma l'utilità della diagnostica istopatologica, che può aggiungere informazioni utili e altrimenti non disponibili. Si ritiene che un ambiente eccessivamente secco e polveroso predisponga allo sviluppo di granulomi da inalazione di frammenti vegetale (Sims e Glastonbury, 1996; Corner e Jericho, 1972). Pertanto, la loro osservazione può rappresentare un *feedback* utile per monitorare ed eventualmente migliorare la qualità dell'aria in allevamento. Il rilievo di granulomi da corpi estranei vegetali in un'unica partita di suini avvalorava l'importanza dei fattori ambientali predisponenti, in presenza dei quali la prevalenza di queste lesioni può raggiungere valori piuttosto elevati.

## BIBLIOGRAFIA

1. Corner A.H., Jericho W.F. (1972) "Pneumonia associated with inhaled plant material in swine". *Vet Pathol.* 9:384-391.
2. Segalés J., Franzo G., Larsen L.E., Nauwynck H., Opriessnig T., Stadejek T., Vannucci F. (2025) "Knowledge gaps in research and control of porcine circovirus 2 (PCV2) infections". *BMC Vet Res.* 22:14.
3. Sims L.D., Glastonbury J.R.W. (1996) "Pathology of the Pig: A Diagnostic Guide," 1<sup>st</sup> ed., Victoria, Australia, Pig Research and Development Corporation.
4. Zachary J.F. (2017) "Pathologic basis of veterinary disease" 6<sup>th</sup> ed., Saint Louis, Missouri, Elsevier.
5. Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., Zhang J. (2019) "Diseases of swine" 11<sup>th</sup> ed., Hoboken, NJ, Wiley Blackwell.

# INDAGINE PRELIMINARE SU DIVERSI METODI PER RILEVARE LA PRESENZA DI INFLUENZA A IN ALLEVAMENTI DI SUINI COMMERCIALI

## PRELIMINARY STUDY ON DIFFERENT METHODS TO DETECT INFLUENZA A VIRUS IN ITALIAN PIG HERDS

CORDIOLI B.<sup>1</sup>, TODESCHI M.<sup>2</sup>, CANELLI E.<sup>2,3</sup>, ARIOLI E.<sup>3</sup>, SOLIANI L.<sup>1</sup>, TORREGGIANI C.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>, CHIAPPONI C.<sup>1</sup>, PROSPERI A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna-Laboratorio di riferimento WOAH per l'Influenza suina;

<sup>2</sup>Università di Parma;

<sup>3</sup>Veterinario suiatra

**Parole chiave:** Influenza A, monitoraggio, suini

**Key words:** Influenza A virus, detection, swine

### Riassunto

In questo studio preliminare condotto in 10 allevamenti del Nord Italia si volevano paragonare diversi metodi per rilevare la presenza del virus Influenzale di tipo A del suino (IAV-S).

I gruppi campionati sono stati valutati dal punto di vista clinico tramite il *Respiratory Clinical Score* (RCS, 1-3) e successivamente sono stati eseguiti tamponi nasali (~30/azienda, analizzati in *pool* da 5) e fluidi orali (~5 corde/azienda). Il campionamento di aria è stato eseguito con lo strumento Sartorius MD8-AirPort (50L al minuto per 45 min) all'interno e nelle immediate vicinanze dell'edificio. Tutti i campioni sono stati analizzati in *real-time* RT-PCR per la presenza di IAV-S e i campioni positivi sono stati tipizzati con nested RT-PCR.

Nonostante nella maggior parte dei gruppi non ci fosse sintomatologia respiratoria (RCS=1), in quasi tutte le aziende almeno una tipologia di campione è risultata positiva. La prevalenza in tamponi nasali e fluidi orali è risultata del 40%, con risultati non concordi in 2 aziende. I campioni d'aria raccolti all'interno dell'edificio non hanno mai dato Ct<34, mentre in 7 casi su 9 l'aria all'esterno dell'edificio è risultata negativa. Ad eccezione di un'azienda, in cui la tipizzazione parziale del ceppo rilevato nell'aria differiva da quello rilevato nelle altre tipologie di campioni (H1ANx vs H1CN2), nella maggior parte delle aziende positive si è rilevato un solo ceppo virale (5 H1CN1, 1 H1CN2, 1 H1AN1).

### Abstract

This preliminary study compares different sampling methods to monitor the presence of Influenza A viruses of Swine (IAV-S) in 10 Northern-Italian farms.

Pens were evaluated by means of the *Respiratory clinical score* (RCS, 1-3), then both nasal swabs (NS) (~30/farm, analysed in pool of 5) and oral fluids (OF) (~5 ropes/farm) were sampled. Air sampling was performed using Sartorius MD8-AirPort device (50L per minute during 45 min) inside and outside the building. Samples were screened for IAV-S by real-time RT-PCR and positive samples were molecularly subtyped via nested RT-PCR. At least one sample tested positive in 9/10 farms, even though in 7/10 farms RCS was 1. Overall, 40% of NS and OF tested positive, with discrepancies observed in only two farms. Indoor air sampling never yielded Ct value below 34, while almost 80% of outside air

samples were negative. In most of the positive farms, a single strain was detected from NS and/or OF (5 H1CN1, 1 H1CN2, 1 H1AN1). Interestingly, in one farm, partial subtyping of 1 air sample (H1ANx) was performed, with H1CN2 positivity in NS and OF. IAV-S was often present without relevant respiratory clinical signs. NS are considered the gold standard for detection, and OF confirmed their potential for group monitoring. Except for one farm, all sampling methods confirmed the circulation of a single viral subtype only.

## INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria del suino (*Porcine Respiratory Disease Complex*, PRDC) impatta negativamente sul benessere animale e determina importanti perdite economiche legate al calo delle performance zootecniche e al trattamento degli animali colpiti (Vincent Baker & Van Reeth, 2025). Gli agenti eziologici coinvolti sono principalmente di natura batterica e virale. In particolare, i principali virus coinvolti sono il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV), il Circovirus suino di tipo 2 (PCV-2) e i virus dell'influenza A suina (IAV-S).

Clinicamente IAV-S può provocare malattia acuta a carico delle vie aeree superiori con elevata morbilità e scarsa mortalità, con variazioni legate al ceppo virale e allo stato immunitario degli animali coinvolti (Er et al., 2014). Sebbene alcuni ceppi di virus influenzale circolino nei suini senza causare segni clinici, tra i sintomi principali si registrano febbre alta, tosse, starnuti, scolo nasale e in alcuni casi congiuntivite. Tali segni clinici compaiono generalmente 1-3 giorni dall'infezione e si risolvono nell'arco di 3-7 giorni se non intervengono complicazioni (infezioni batteriche secondarie).

La diagnosi clinica presuntiva deve essere confermata da test diagnostici di laboratorio che evidenzino la presenza dell'agente eziologico rilevandone l'acido nucleico (RT-PCR). Infatti, i virus influenzali (famiglia *Orthomyxoviridae*) hanno un genoma a ssRNA costituito da 8 segmenti, che, per sua natura, favorisce fenomeni di riassortimento genico incrementando la variabilità genotipica e, di conseguenza, fenotipica dei virus. In particolare, la variabilità virale si esprime anche nella classificazione in sottotipi sulla base delle glicoproteine di membrana, l'emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA) (Vincent Baker & Van Reeth, 2025).

L'incredibile variabilità dei virus influenzali è dovuta al ruolo svolto dal suino come “*mixing vessel*” per il riassortimento e la generazione di nuovi ceppi virali in seguito alle frequenti introduzioni di IAV da altre specie (aviari e uomo) (Zell et al., 2013). Contrariamente a quanto si creda, il passaggio di virus dall'uomo al suino è comune e vede negli operatori di stalla i principali mediatori del riassortimento virale (Krueger & Gray, 2013). La possibilità che si sviluppino varianti ad alto rischio per la salute pubblica rende necessario un attento monitoraggio di queste interazioni (Torremorell et al., 2012).

Il monitoraggio continuo dei virus circolanti negli allevamenti suini del Nord Italia effettuato dai laboratori IZSLER, in accordo con quanto riportato dalla bibliografia internazionale, ha evidenziato sia la circolazione dei 3 sottotipi endemici (H1N1, H1N2, H3N2), sia una notevole diversità genetica e antigenica, che comporta l'esistenza di una moltitudine di genotipi differenti (Chiapponi et al., 2021; Coggon et al., 2025). In particolare, si è evidenziato il riassortimento tra genotipi appartenenti a lineaggi differenti, nei quali è ricorrente la presenza di geni H1N1pdm09.

A tale scopo, il monitoraggio dei virus circolanti nella specie suina risulta cruciale. Nell'ottica di migliorare le strategie di campionamento per rilevare la presenza di IAV-S questo studio intende confrontare le performance di diversi metodi di campionamento in allevamenti con sindrome respiratoria in atto o con ricorrenti positività per IAV-S, includendo campioni di aria prelevata dentro e fuori dall'edificio.

## MATERIALI E METODI

### *Selezione degli allevamenti e Respiratory Clinical Score*

In autunno 2025 sono stati eseguiti i sopralluoghi in una selezione di 10 allevamenti intensivi del Nord-Italia delle province di Brescia, Cremona, Mantova, Parma, Piacenza, Reggio Emilia e Verona, prediligendo aziende con pregresse positività a IAV-S o con forma clinica respiratoria acuta in atto.

Negli allevamenti con storica positività per IAV-S i gruppi campionati sono stati scelti in base alla fase del ciclo produttivo (se sito 1, 1+2, 2 o 3). Nei siti 1 sono stati campionati suinetti durante l'ultima settimana di lattazione e nei siti 1+2 sono stati campionati i soggetti in svezzamento (sito 2). Nei siti 2 e 3 si è preferito testare animali con forma clinica respiratoria in atto e, se assenti, i gruppi campionati sono stati scelti casualmente in svezzamento e durante la prima settimana di accasamento nei gruppi di ingrasso.

Al momento della visita in allevamento è stato applicato il *Respiratory Clinical Score* per registrare l'eventuale presenza e gravità di segni clinici respiratori (Corzo et al., 2013). I punteggi variano da 1 a 3, dove "1" corrisponde a tosse in meno del 25% degli animali del gruppo, "2" nel caso in cui ci fossero tosse e starnuti nel 25–75%; e "3" nel caso in cui si evidenziassero tosse, starnuti e letargia nel 75% degli animali del gruppo o più.

### *Campionamento*

Sono stati campionati da 4 a 5 box in ogni azienda e generalmente ogni box era costituito da circa una trentina di animali.

I campioni di fluidi orali sono stati raccolti con corde di materiale naturale (cotone) (*Oral fluid sample collection accessory* kit, IDEXX) scomposte in tre fili e di diametro 1-1.5 cm e sospese all'altezza della spalla degli animali per circa 20-30 minuti. In ogni azienda sono state posizionate dalle 4 alle 5 corde, in box diversi (1corda/box) e sale diverse.

I tamponi nasali sono stati eseguiti negli stessi box in cui sono stati raccolti i fluidi orali, in numero variabile da 15 a 30 per ogni azienda. Si è proceduto inserendo il tampone in direzione dorso-mediale in entrambe le cavità nasali con movimento circolare per circa 5 secondi. Il tampone è stato successivamente immerso in un mezzo di trasporto liquido commerciale (Virocult, MWE MW951SENT-ALIFAX) progettato per mantenere vitali virus eventualmente presenti.

Ad eccezione dell'allevamento 10, in tutti gli allevamenti visitati ai campioni tradizionalmente utilizzati per rilevare la presenza di IAV-S è stato aggiunto un campione di aria utilizzando lo strumento Sartorius MD8-AirPort, campionatore di aria portatile che tramite aspirazione permette il passaggio di un volume predefinito di aria attraverso un filtro monouso con pori di circa 3 µm di diametro, da destinare alle analisi di laboratorio. Sulla base della bibliografia lo strumento è stato impostato per aspirare 50L/minuto per 45 minuti, sia all'interno che all'esterno dell'edificio (Corzo et al., 2013; Jonges et al., 2015). All'interno del capannone il dispositivo è stato spostato ogni 15 minuti per campionare diversi box in diverse sale così da eseguire il prelievo negli stessi gruppi campionati con corde e tamponi nasali, mentre all'esterno dell'edificio è stato posizionato in corrispondenza del punto di fuoriuscita della ventilazione forzata o, in caso di ventilazione naturale, in un punto di fuoriuscita dell'aria. Immediatamente dopo il campionamento, il filtro è stato rimosso con pinze sterili e sciolto in 10 ml di MEM antibiotato + 2% siero fetale bovino.

Le diverse tipologie di campione sono state conservate refrigerate (4 °C) fino alla consegna al laboratorio, avvenuta entro 24 ore.

### *Analisi virologiche*

I tamponi nasali sono stati analizzati in *pool* da 5, mentre i fluidi orali e i filtri del campionatore di aria sono stati analizzati singolarmente in quanto considerati già campioni "aggregati", rappresentativi del gruppo/stanza/immediate vicinanze dell'edificio.

Tutti i campioni sono stati analizzati in *Real Time* RT-PCR con target sul gene M di IAV-S (Chiapponi et al., 2021). I risultati ottenuti sono stati interpretati sulla base del valore soglia del ciclo (Ct) e suddivisi in:

- Valori Ct bassi (< 30) che indicano un'elevata concentrazione del target della RT-PCR (++);
- Valori Ct medi (30 - 35): che indicano una concentrazione non elevata (+);
- Valori Ct elevati (> 35): che indicano una concentrazione molto bassa del target, interpretabile come dubbio o da confermare (±).
- Negativo: che indica l'assenza del target della RT-PCR nel campione in analisi.

Per monitorare la presenza del virus dell'influenza A è fondamentale accertarne la presenza (rilevamento qualitativo), mentre la quantificazione non rappresentava un requisito essenziale in questa fase di studio.

Una selezione dei campioni risultati positivi è stata successivamente tipizzata utilizzando metodi convenzionali in grado di differenziare i virus HxNy geneticamente distinti (Chiapponi et al., 2021). In caso di positività da diverse tipologie di campioni, la tipizzazione è stata eseguita da almeno un campione per tipo, prediligendo quelli con Ct più bassi.

## RISULTATI

### *Respiratory Clinical Score*

Nella pratica la sintomatologia osservata si è leggermente discostata dallo score proposto. Nella maggior parte delle aziende (7 su 10) è stato assegnato lo score 1 sebbene la tosse (presente in meno del 25% del capannone) non fosse il segno clinico principale ed i sintomi più rilevanti fossero dispnea e abbattimento del sensorio, comunque riscontrati in una percentuale di animali inferiore al 25% del totale.

In due aziende lo score assegnato è stato 2; la sintomatologia includeva tosse e starnuti affiancati da dispnea e un forte abbattimento del sensorio in una percentuale di capi che oscillava tra il 30% e il 75% del totale.

Una sola azienda ha ricevuto lo score 3, in quanto è stata riscontrata tosse persistente e starnuti in quasi tutto il capannone (circa nel 90% degli animali).

**Tabella 1.** Tipologia di ventilazione, segni clinici e RCS di ogni azienda inclusa nello studio.

**Table 1.** Type of ventilation, clinical signs, and PCR results for each farm included in the study

Id azienda	Ventilazione	Segni clinici	RCS
1	Naturale	Dispnea e abbattimento del sensorio	1
2	Forzata	Dispnea e abbattimento del sensorio	1
3	Naturale	Dispnea e forte abbattimento del sensorio	2
4	Naturale	Abbattimento del sensorio	1
5	Naturale	Tosse persistente e starnuti	3
6	Naturale	Tosse	1
7	Forzata	Tosse	1
8	Naturale	Tosse e starnuti	2
9	Naturale	Tosse	1
10	Naturale	Tosse	1

### Analisi virologiche

In totale sono stati analizzati 55 *pool* di tamponi nasali, 41 campioni di fluidi orali e 18 campioni di filtri d'aria (all'interno e all'esterno dell'allevamento). In nove aziende su dieci almeno una tipologia di campione è risultata positiva e in 7 si è verificata concordanza tra i risultati (almeno un *pool* di tamponi nasali e un campione di fluidi orali risultati positivi). Invece, in 2 allevamenti sono risultati positivi solo fluidi orali (azienda 3) e tamponi nasali (azienda 1). Solo in un caso il filtro di aria campionato all'interno dell'edificio è risultato con Ct compresi tra 30 e 35 (+, azienda 7).

I risultati delle analisi virologiche eseguite sulle diverse tipologie di campioni sono schematizzati in Tabella 2.

**Tabella 2.** Risultati delle analisi virologiche nelle diverse tipologie di campione analizzate.

**Table 2.** Results of the virological analyses in the different types of samples.

Ct (simbolo)	Fluidi orali		Tamponi nasali		Filtri aria interno		Filtri aria esterno	
	Nr.	%	Nr. <i>pool</i>	%	Nr.	%	Nr.	%
<30 (++)	8	20	13	24	0	0	0	0
30-35 (+)	8	20	9	16	1	11.1	0	0
>35 (±)	10	24	11	20	2	22.2	2	22.2
Negativo (-)	15	36	22	40	6	66.7	7	77.8

Note: “++”:target della RT-PCR presente in elevata concentrazione; “+”: target presente a concentrazione non elevata; “±”: target presente bassa concentrazione; “-“:assenza del target della RT-PCR

Il 40% dei fluidi orali e dei tamponi nasali è risultato positivo (++) e +) e rispettivamente il 37 e 40% è risultato negativo. Il rimanente 24% dei fluidi orali e 20% dei tamponi nasali corrisponde ad una bassa positività (±).

Le analisi eseguite sui filtri dell'aria campionata all'interno dell'edificio sono risultate prevalentemente negative, in alcuni casi con valori di Ct medi e bassi (+ e ±). Tali risultati non sono del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti dalle analisi condotte sui filtri dell'aria esterna all'edificio, con 7/9 campioni negativi.

Ad eccezione di un'azienda, in cui la tipizzazione parziale del ceppo rilevato nell'aria differiva da quello rilevato nelle altre tipologie di campioni (H1ANx vs H1CN2), nella maggior parte delle aziende positive si è rilevato un solo ceppo virale (5 H1CN1, 1 H1CN2, 1 H1AN1).

### DISCUSSIONE

L'obiettivo dello studio era confrontare, in modo preliminare, le performance di diversi metodi di campionamento per rilevare la presenza di IAV-S in allevamenti con sindrome respiratoria in atto o con ricorrenti positività per IAV-S, includendo campioni di aria prelevata all'interno dei capannoni e nelle immediate vicinanze di questi.

Il *Respiratory Clinical Score* è stato impiegato come un indicatore clinico dei sintomi respiratori al momento del campionamento e in quasi tutte le aziende erano presenti in forma lieve, con pochi casi più gravi. I risultati delle analisi virologiche hanno evidenziato una correlazione non univoca tra la gravità della forma clinica (RCS) e l'esito delle indagini di laboratorio. Infatti, ad eccezione di un'azienda dove la presenza di IAV-S non è mai stata rilevata, almeno un tipo di campione per allevamento è risultato positivo. Inoltre, nelle

aziende con tamponi nasali e fluidi orali fortemente positivi, spesso il RCS era pari a 1 (segni clinici in un ridotto numero di capi), mentre nelle aziende con sintomatologia più moderata (aziende 3 e 5) i campioni hanno dato risultati eterogenei. Nell'azienda 3 il RCS assegnato era 2 con dispnea e forte abbattimento del sensorio, ma sia i tamponi nasali sia l'80% dei fluidi orali sono risultati negativi e solo il filtro di aria interno all'edificio era debolmente positivo ( $\pm$ ). Invece, sia nell'azienda 5 (RCS =3 con tosse persistente e starnuti) che nell'azienda 8 (RCS = 2 con tosse e starnuti) si è evidenziata solo positività (++) e (+) nei tamponi nasali e debole positività ( $\pm$ ) nei fluidi orali. Trattandosi di un monitoraggio mirato a rilevare la presenza di IAV-S, non si può escludere che altri patogeni del PRDC possano aver contribuito al manifestarsi dei segni clinici respiratori, tra cui il virus della PRRS, la cui interazione con IAV-S è nota (Bougon et al., 2021).

Considerando i campioni nel loro insieme, al momento del sopralluogo in 9/10 allevamenti c'era attiva circolazione virale con almeno una tipologia di campione risultata positiva per IAV-S. Apparentemente fluidi orali e tamponi nasali hanno evidenziato la medesima prevalenza (40% tra campioni ++ e +), con risultati non concordi in 2 allevamenti. Infatti, mentre nell'azienda 1 solo i tamponi nasali sono risultati positivi, nell'azienda 7 il 100% dei fluidi orali era positivo (Ct 29-33) a fronte di 2/6 *pool* di tamponi nasali risultati negativi e 1/6 debolmente positivo (Ct >35). I tamponi nasali sono considerabili il campione ideale per la ricerca di IAV-S, ma è anche il più dispendioso da realizzare in termini di tempo, energia e impiego di risorse umane, soprattutto se da eseguire in animali all'ingrasso. Il prelievo dei fluidi orali, invece, sfrutta un comportamento naturale del suino e offre informazioni sanitarie rappresentative del gruppo, è agevole e rapido da ottenere, ma deve essere correttamente prelevato e conservato perché il risultato possa considerarsi attendibile. Infatti, animali febbrili e/o viremici potrebbero essere letargici e/o con abbattimento del sensorio e di conseguenza non essere interessati alla masticazione delle corde. Avendo testato gli stessi gruppi di animali con entrambi i metodi di campionamento, i risultati suggeriscono una capacità paragonabile di rilevare la presenza di IAV-S, ma per interpretare correttamente i risultati è necessaria un'adeguata analisi statistica. Occorre precisare che, nella pratica clinica, la scelta tra le due tipologie di campionamento è strettamente legata all'obiettivo dell'indagine. Qualora si intenda effettuare un monitoraggio per valutare la circolazione virale a livello di popolazione, i fluidi orali rappresentano il campione d'elezione; questi risultano particolarmente efficaci in presenza di forme sub-cliniche, dimostrandosi talvolta più indicativi rispetto ai tamponi nasali. Al contrario, ai fini della diagnosi clinica, il campionamento deve essere individuale e mirato su soggetti in fase acuta che presentino una sintomatologia manifesta (Henao-Diaz et al., 2020).

Nonostante la quantità di virus presente nelle alte vie aeree sia più elevata rispetto a quella circolante nell'aria, l'analisi dei filtri ha comunque portato a delle positività, da considerare anche in relazione al tipo di ventilazione presente in allevamento. Nelle due aziende con ventilazione forzata in ingresso (2 e 7) i filtri sono risultati positivi al virus solo in un'azienda con Ct = 34,34 (azienda 7). Lasciando ipotizzare che in alcuni casi questo tipo di ventilazione, nonostante un maggior controllo della temperatura, possa permettere la diffusione di IAV-S nella stanza dovuto alla ridotta circolazione di aria, soprattutto in presenza di animali sintomatici ed escretori di grandi quantità di virus. Nonostante l'elevata escrezione virale da parte degli animali infetti, è però possibile che nell'aria non sia presente una quantità di virus rilevabile con gli strumenti di campionamento in uso data la negatività nella maggior parte dei filtri d'aria testati.

L'analisi dei filtri d'aria all'esterno degli edifici ha evidenziato solo debolissime positività in 2 aziende: la n. 1 con Ct=41 e la n.6 con Ct=42, dove anche il filtro dell'aria interno all'edificio è risultato debolmente positivo. Tale risultato può essere stato condizionato dalla maggiore

circolazione di aria all'esterno del capannone nonostante il posizionamento strategico dello strumento in prossimità della fuoriuscita della ventilazione (naturale /forzata). Considerato il limite legato al posizionamento dello strumento non sempre possibile in prossimità della fuoriuscita di aria (altezza e/o presenza di ostacoli), questo dato suggerisce la scarsa concentrazione di IAV-S all'esterno dell'edificio, limitando l'eventualità che si verifichi trasmissione aerogena interaziendale. Infatti, anche nelle aziende in cui i tamponi nasali e le corde avevano bassi valori di Ct (++ e +), i filtri d'aria campionati all'esterno del capannone erano negativi o debolmente positivi ( $\pm$ ). Tale dato evidenzia anche come la biosicurezza strutturale dell'azienda possa essere un elemento da considerare per limitare la diffusione/ingresso del virus in allevamento.

I risultati delle tipizzazioni virali hanno evidenziato come nella maggior parte delle aziende positive si è rilevato un solo ceppo virale (5 H1CN1, 1 H1CN2, 1 H1AN1), confermando la prevalenza del lineaggio H1C già evidenziata da recenti studi (Chiapponi et al., 2021). Inoltre, nell'azienda 7, la tipizzazione parziale del ceppo presente nell'aria all'interno dell'allevamento differiva da quella rilevata nelle altre tipologie di campioni (H1ANx vs H1CN2).

Un monitoraggio continuo durante tutto l'anno (anche nel periodo di minor circolazione virale es: estate) è importante per la gestione dell'influenza suina. Questa necessità nasce dal fatto che l'infezione può verificarsi in qualsiasi momento, con conseguenze più gravi in animali non vaccinati. Infatti, la vaccinazione può contribuire a ridurre le manifestazioni cliniche e c'è evidenza di una ridotta escrezione del virus con conseguente minor probabilità di riassortimento (López-Valiñas et al., 2023; Mancera Gracia et al., 2020).

## CONCLUSIONI

I tamponi nasali analizzati in *pool* e i campioni di fluidi orali si sono confermati efficaci nel rilevare la presenza di IAV-S in allevamento con la medesima prevalenza (40% campioni ++ e +). Al contrario, i risultati delle analisi condotte sui filtri d'aria suggeriscono che non sia un metodo affidabile per rilevare la presenza del virus in allevamento. Infatti, nonostante l'elevata escrezione virale da parte degli animali infetti, è possibile che nell'aria non sia presente una quantità di virus rilevabile con gli strumenti di campionamento in uso. Attualmente, il lineaggio H1CN1 si conferma quello maggiormente rilevato nella selezione di allevamenti coinvolti in questo studio pilota.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bougon, J., Deblanc, C., Renson, P., Quéguiner, S., Gorin, S., Mahé, S., Le Dimna, M., Barbier, N., Paboeuf, F., Simon, G., & Bourry, O. (2021). *Successive Inoculations of Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) and Swine H1N2 Influenza Virus Suggest a Mutual Interference between the Two Viral Infections*. MDPI AG. 10.3390/v13112169
2. 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*. MDPI AG. 10.3390/v14010047
3. Coggon, A., Lopes, S., Simon, G., Arendsee, Z., Chen, K., Chiapponi, C., Essen, S., Everett, H., Hervé, S., Hufnagel, D. E., Mollett, B., Moreno, A., Pekosz, A., Richard, G., Rothman, R. E., Shaw-Saliba, K., Van Reeth, K., Venkatesh, D., Brown, I. H., Lewis, N. S. (2025). Quantifying the zoonotic risk profile of European influenza A viruses in swine from 2010 to 2020 inclusive. *Journal of Virology*, 99(7), e0030625. 10.1128/jvi.00306-25

4. Corzo, C. A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R. B., & Torremorell, M. (2013). Airborne Detection and Quantification of Swine Influenza A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. *PLoS ONE*, 8(8), e71444. 10.1371/journal.pone.0071444
5. Er, C., Lium, B., Tavornpanich, S., Hofmo, P. O., Forberg, H., Hauge, A. G., Grøntvedt, C. A., Framstad, T., & Brun, E. (2014). Adverse effects of Influenza A(H1N1)pdm09 virus infection on growth performance of Norwegian pigs - a longitudinal study at a boar testing station. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 284. 10.1186/s12917-014-0284-6
6. Jonges, M., van Leuken, J., Wouters, I., Koch, G., Meijer, A., & Koopmans, M. (2015). Wind-Mediated Spread of Low-Pathogenic Avian Influenza Virus into the Environment during Outbreaks at Commercial Poultry Farms. *PloS One*, 10(5), e0125401. 10.1371/journal.pone.0125401
7. Krueger, W. S., & Gray, G. C. (2013). Swine Influenza Virus Infections in Man. *Current topics in microbiology and immunology* (pp. 201–225). Springer Berlin / Heidelberg. 10.1007/82\_2012\_268
8. Henao-Diaz, A., Giménez-Lirola, L., Baum, D. H., & Zimmerman, J. (2020). Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. *Porcine health management*, 6(1), 28.
9. López-Valiñas, Á, Valle González, M., Wang, M., Darji, A., Cantero, G., Chiapponi, C., Segalés Coma, J., Ganges, L., & Núñez, J. I. (2023). Vaccination against swine influenza in pigs causes different drift evolutionary patterns upon swine influenza virus experimental infection and reduces the likelihood of genomic reassortments. <https://ddd.uab.cat/record/274418>
10. Mancera Gracia, J. C., Pearce, D. S., Masic, A., & Balasch, M. (2020). Influenza A Virus in Swine: Epidemiology, Challenges and Vaccination Strategies. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 647. 10.3389/fvets.2020.00647
11. Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., & Gramer, M. (2012). Transmission of Influenza A Virus in Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(s1), 68–84. 10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x
12. Vincent Baker, A. L. & Van Reeth, K. (2025). Influenza Viruses. In J. J. Zimmerman, E. R. Burrough, L. R. Karriker, K. J. Schwartz & J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine 12th Ed.* (pp. 645–663). John Wiley & Sons.
13. Zell, R., Scholtissek, C., & Ludwig, S. (2013). Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. *Current topics in microbiology and immunology* (pp. 29–55). Springer Berlin / Heidelberg. 10.1007/82\_2012\_267

# **COMPUTER VISION AL MACELLO: CLASSIFICAZIONE DELLE CARCASSE IN BASE AL SESSO**

## **COMPUTER VISION ALONG THE SLAUGHTER CHAIN: CARCASS GENDER RECORDING**

D'ANGELO M.<sup>1</sup>, D'ALTERIO R.<sup>2</sup>, ARMENI B.<sup>1</sup>, ROBBE D.<sup>1</sup>, KHORASHADIZADEH M.<sup>2</sup>, CAPOBIANCO DONDONA A.<sup>2</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Teramo;*

<sup>2</sup>*Farm4trade s.r.l., Atessa (Chieti)*

**Parole chiave:** suino, macello, intelligenza artificiale, genere

**Key words:** *swine, slaughter, artificial intelligence, gender*

### **Riassunto**

Il macello è un nodo informativo cruciale, ove convergono dati produttivi, sanitari e qualitativi degli animali allevati. La raccolta efficace ed efficiente di dati su vasta scala offre indiscutibili vantaggi ma richiede strumenti in grado di operare in tempo reale, in ambienti ad elevata intensità operativa e con un elevato grado di standardizzazione. In questo contesto, le tecnologie basate sull'intelligenza artificiale si propongono prepotentemente per soddisfare in modo concreto tali esigenze. Lo studio si è posto l'obiettivo di addestrare una rete neurale convoluzionale (ResNet-18) per classificare le carcasse suine in base al sesso. Allo scopo sono state impiegate 595 immagini di altrettante carcasse, acquisite automaticamente al macello. I risultati finora ottenuti, seppur assolutamente preliminari, sono molto promettenti con livelli di accuratezza superiori all'85%. Da notare che le immagini erano state raccolte con tutt'altra finalità. Questo è un aspetto non trascurabile, poiché permette di ottimizzare le risorse impiegate, massimizzando la mole di informazioni utili per l'intera filiera produttiva.

### **Summary**

*The abattoir represents a key hub where productive, health-related, and quality data converge. The effective and efficient large-scale collection of data offers undeniable advantages, although it requires tools capable of operating in real time, within high-intensity operational environments, and with a high degree of standardization. In this context, artificial intelligence-based technologies emerge as a compelling tool to concretely meet these needs. This study aimed to train and test a convolutional neural network (ResNet-18) in order to classify pig carcasses according to sex. Overall, 595 images of as many carcasses were used, automatically acquired at the slaughterhouse. The results obtained so far, although preliminary, are very promising, with accuracy levels over 85%. It is worth noting that the images had originally been collected for a different task. This is a non-negligible aspect, as it enables optimization of the resources employed, maximizing the amount of useful information for the entire pork chain.*

### **INTRODUZIONE**

La raccolta strutturata e standardizzata di dati rappresenta uno strumento strategico per il miglioramento continuo delle filiere zootecniche. In tale prospettiva, il macello costituisce un nodo informativo cruciale, in cui convergono dati produttivi, sanitari e qualitativi relativi agli animali allevati. La disponibilità di informazioni oggettive, su larga scala e correttamente integrate consente l'implementazione di sistemi di sorveglianza epidemiologica, il monitoraggio del benessere animale, il perfezionamento della classificazione commerciale delle carcasse e la restituzione di un *feedback* mirato agli allevatori (Anonimo, 2013).

Tuttavia, la raccolta efficace ed efficiente di grandi volumi di dati lungo la catena di macellazione richiede strumenti in grado di operare in tempo reale, in ambienti ad elevata intensità operativa e con un elevato grado di standardizzazione. In questo contesto, lo sviluppo di tecnologie basate sull'intelligenza artificiale consente di soddisfare in modo concreto tali esigenze, automatizzando l'acquisizione e l'analisi delle informazioni e riducendo la variabilità legata all'operatore. In particolare, le tecniche di *computer vision* (CV) possono giocare un ruolo centrale. Nata negli anni '70 nell'ambito dell'automazione industriale, la CV abilita i sistemi digitali all'estrazione di informazioni semantiche da immagini e sequenze video. Inizialmente applicata al riconoscimento di *pattern* e al controllo di processo, la CV ha conosciuto un'evoluzione significativa grazie all'integrazione con algoritmi di *deep learning*, trovando impiego nella diagnostica medica e in numerosi ambiti ad alta complessità decisionale (Fernandes *et al.*, 2020). L'applicazione della CV alla filiera delle carni ne consentirebbe un monitoraggio continuo, oggettivo e non invasivo, rendendo possibile l'estrazione automatizzata di parametri morfometrici, biometrici e classificativi, contribuendo a una gestione sempre più *data-driven* e orientata al controllo di processo (Fernandes *et al.*, 2020; Sandberg *et al.*, 2023). In piena sintonia con quanto appena espresso, questo studio si pone l'obiettivo di addestrare una rete neurale convoluzionale (*Convolutional Neural Network*, CNN) per classificare le carcasse suine in base al sesso.

## MATERIALI E METODI

### Acquisizione e preparazione del *dataset*

L'intero *dataset* al momento è composto da 595 immagini, acquisite lungo la linea di macellazione – dopo le fasi di scottatura, spazzolatura e flambatura della carcassa – mediante un braccio robotico collaborativo a 6 assi, equipaggiato con due telecamere ad alta risoluzione (Figura 1). La maggior parte delle immagini (n = 496) è stata annotata mediante il *software LabelMe*, definendo tre classi morfologiche: “femmina” (è stata annotata la vulva), “maschio” (è stato annotato il sacco scrotale) e “castrato” (è stata annotata la regione perianale).



**Figura 1. Carcasse di suini.** Immagini tipo utilizzate per addestrare la CNN e rappresentative delle tre classi: maschio (A), femmina (B) e castrato (C). Da notare che le immagini sono state collezionate con altro scopo (punteggiatura delle lesioni della coda) e che per il momento sono state impiegate esclusivamente immagini frontali, nella quali la coda talvolta copre lo sfintere anale e/o la vulva.

**Figure 1. Pig carcasses.** Representative images used to train the CNN and corresponding to the three classes: male (A), female (B), and castrated male (C). It should be noted that the images were originally collected for a different purpose (tail lesion scoring) and that, at this stage, only frontal images have been used, in which the tail may occasionally cover the anal sphincter and/or the vulva.

### Pipeline di pre-processing e CV

Al fine di ottimizzare l'addestramento su un *dataset* numericamente contenuto, è stata implementata una *pipeline* di elaborazione volta a ridurre il rumore ambientale e potenziare i dettagli anatomici: a) localizzazione della *Region of Interest* (ROI) – è stata applicata una segmentazione geometrica per isolare esclusivamente il 45% superiore della carcassa, eliminando artefatti e distretti anatomici non significativi;

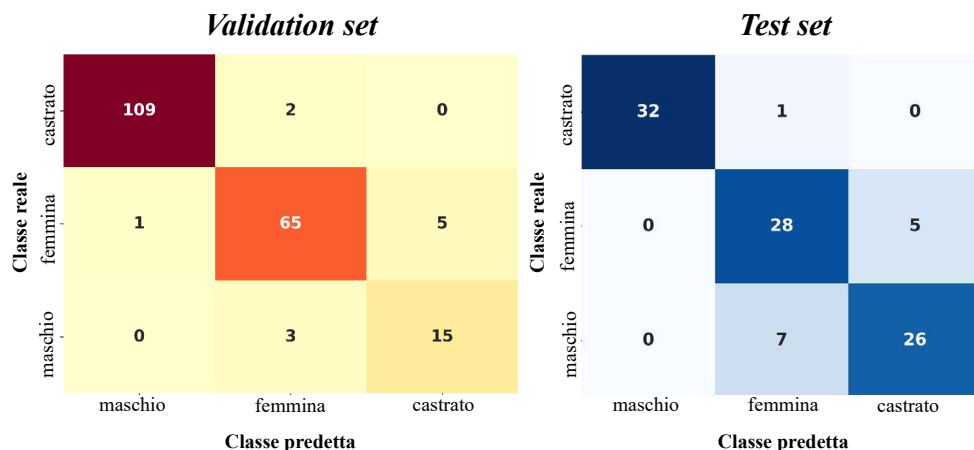
b) miglioramento del contrasto – per ovviare alla scarsa saturazione cromatica dei tessuti e alla variabilità dell'illuminazione, è stata impiegata la tecnica *Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization*. Tale processo ha permesso di esaltare i volumi e i caratteri sessuali primari, rendendo i rilievi anatomici maggiormente discriminabili per l'algoritmo.

**Architettura e strategia di training** – è stata impiegata una CNN ResNet-18 con approccio di *Transfer Learning*. In una prima fase, i *layer* convoluzionali sono stati congelati per preservare le caratteristiche estrattive pre-addestrate su ImageNet, procedendo all'ottimizzazione del solo classificatore finale. Per contrastare lo sbilanciamento tra le classi e la somiglianza morfologica tra femmine e castrati, è stata adottata una *Weighted Cross-Entropy Loss*, assegnando un peso maggiore (2.5) alla classe "femmina".

In totale, 296 immagini sono state utilizzate per l'addestramento della CNN (*training set*), 200 immagini hanno costituito il *validation set* (sottoinsieme di immagini annotate e utilizzate durante il *training* per monitorare le *performance* del modello) e 99 immagini – equamente ripartite fra le 3 classi – sono state usate come *test set* (sottoinsieme di immagini mai somministrate alla CNN né durante il *training* né durante la validazione).

### RISULTATI

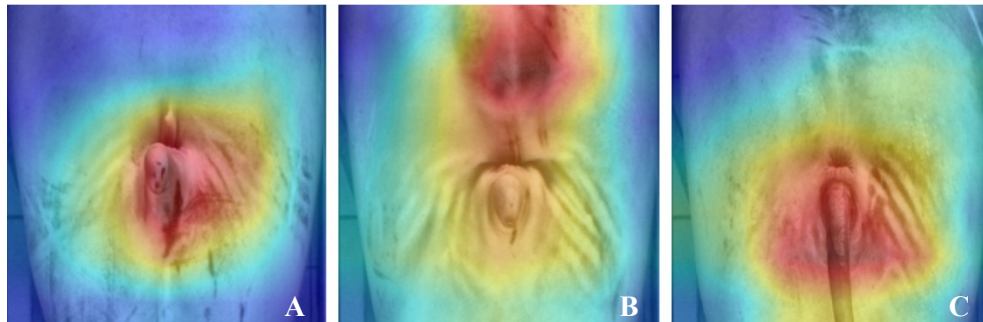
L'accuratezza della CNN valutata sul *validation set* e sul *test set* è stata rispettivamente pari all'88.33% e all'85.8%, con picchi di *confidence* del 99% nell'identificazione della classe "maschio". Le prestazioni della CNN hanno mostrato una convergenza stabile, confermando l'utilità della *Weighted Cross-Entropy Loss* nel ridurre gli errori inizialmente osservati per la classe "femmina" (Figura 2).



**Figura 2. Matrici di confusione.** In entrambi i *set* di immagini, la CNN identifica in modo quasi perfetto la classe "maschio". La maggior parte degli errori riguardano l'errata classificazione di "femmine" come "castrati" e viceversa.

**Figure 2. Confusion matrices.** In both sets, the CNN identifies the "male" class almost perfectly. Most of the errors involve misclassifying "females" as "neutered" and viceversa.

Per verificare l'affidabilità del processo decisionale della CNN, è stata impiegata la tecnica di visualizzazione Grad-CAM (*Gradient-weighted Class Activation Mapping*). Le mappe di calore generate hanno confermato una corretta attivazione dei pesi sinaptici in corrispondenza dei soli distretti anatomici d'interesse (Figura 3). L'assenza di *hotspot* su elementi estranei sostiene l'ipotesi che la classificazione si basa su reali differenze morfologiche.



**Figura 3. Carcasse di suini. Gradient-weighted Class Activation Mapping (Grad-CAM).** L'immagine evidenzia che la CNN riconosce i distretti anatomici di interesse nelle femmine (A), nei maschi (B) e nei castrati (C).

**Figure 3. Pig carcasses. Gradient-weighted Class Activation Mapping (Grad-CAM).** The image highlights that the CNN properly identifies the anatomical ROI in females (A), males (B), and castrated males (C).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le dimensioni del *dataset* e le caratteristiche delle immagini utilizzate per addestrare la CNN rendono il nostro studio assolutamente preliminare. Tuttavia, la classificazione delle carcasse per sesso pare essere un compito piuttosto semplice per la CNN, come dimostrato dai risultati finora ottenuti, senza dubbio parziali ma a dir poco promettenti. Al momento, sono già disponibili migliaia di immagini, ottenute da varie angolature e annotate. La loro inclusione nel *dataset* dovrebbe consentire un ulteriore miglioramento delle *performance*, risolvendo la maggiore criticità incontrata dalla CNN, vale a dire la parziale sovrapposizione fra la base della coda e la regione perianale. Tuttavia, i risultati ottenuti sulle immagini laterali non sono ancora soddisfacenti a causa di due problemi tecnici principali: 1) rumore di fondo determinato dalle altre carcasse presenti nell'immagine, in secondo piano; 2) confusione fra lo scroto e altre strutture anatomiche d'aspetto "globoso" (es. il profilo caudale della coscia). Per concludere, riteniamo utile puntualizzare un ultimo aspetto. Come già anticipato, le immagini, pur raccolte con tutt'altra finalità, si prestano bene per acquisire ulteriori informazioni. Di fatto, oltre alla stima del *tail-biting* come indicatore *iceberg* di benessere in allevamento, esse consentirebbero di classificare le carcasse in base al sesso, di tracciare gli animali attraverso la lettura di tatuaggi (strumento già disponibile e operativo in alcuni macelli; <https://www.f4tlab.com/readop>), di valutare morfologia ed eventuali difetti della carcassa, di rilevare alcune condizioni patologiche (es. malrossino, pigmentazioni patologiche, ascessi, lesioni traumatiche acute) etc. Questo è un aspetto non trascurabile, poiché sta a significare che è possibile ottimizzare le risorse (es. implementazione dell'*hardware* in catena di macellazione), massimizzando la mole di informazioni utili per l'intera filiera produttiva. Ovviamente, l'addestramento sarà più agevole e rapido per categorizzare le carcasse in base a *pattern* di comune riscontro e facilmente discriminabili (es. identificazione di genere), mentre sarà più lungo e complesso nei confronti di altri *target* specifici (es. ascessi), meno

frequenti, più soggettivi e/o più eterogenei per forma, dimensioni, numeri e distribuzione sulla carcassa.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Anonimo (2013) “Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat “. EFSA J. 11:6.
2. Fernandes A.F.A., Rebouças Dórea J.R., de Magalhães Rosa J. (2020) “Image analysis and computer vision applications in animal sciences: an overview”. Front Vet Sci. 7:551269.
3. Sandberg M., Ghidini S., Alban L., Capobianco Dondona A., Blagojevic B., Bouwknecht M., Lipman L., Seidelin Dam J., Nastasijevic I., Antic D. (2023) “Applications of computer vision systems for meat safety assurance in abattoirs: A systematic review”. Food Control 150:109768.109768.

**L'INTRECCIO UOMO-SUINO:  
L'EMERGENZA DI NUOVI VIRUS INFLUENZALI H3N2  
DI ORIGINE UMANA NEL NORD ITALIA**

***THE HUMAN-SWINE ENTANGLEMENT: EMERGENCE  
OF NOVEL HUMAN-ORIGIN H3N2 INFLUENZA VIRUSES  
IN NORTHERN ITALY***

SOLIANI L., MESCOLIA A., ZANNI I., BAIONI L., ALBORALI G., MAISANO A.,  
MORENO A., FACCINI S., ROSIGNOLI C., DE LORENZI G., PUPILLO G.,  
FIORENTINI L., TORREGGIANI C., CORDIOLI B., PROSPERI A., LUPPI A.,  
CHIAPPONI C.

*Laboratorio di Riferimento WOAH per l'Influenza Suina, Istituto Zooprofilattico  
Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia, Italia;*

**Parole chiave:** virus influenza suina, H3N2, sorveglianza

**Key Words:** swine influenza viruses, H3N2, surveillance

**Riassunto**

Negli ultimi anni, i quattro principali sottotipi del virus dell'influenza A suina (IAV-S) circolanti nell'UE sono stati H1avN1, H1huN2, H1N1pdm09 e H3N2. Quest'ultimo è emerso nel 1984 da un evento di riassortimento tra un virus H3N2 stagionale umano e un H1avN1, ed è attualmente rilevato a bassa prevalenza in Italia. Questo studio descrive 25 isolati di IAV-S H3N2 appartenenti a tre nuovi genotipi, rilevati per la prima volta in Italia nel 2021, derivanti probabilmente da eventi di riassortimento tra virus influenzali suini e umani. Il primo genotipo era caratterizzato da un'emoagglutinina (H3 HA) di origine umana stagionale, una neuraminidasi (N2 NA) derivata da ceppi H1huN2 circolanti nei suini italiani e una cassetta genica interna (IGC) di tipo aviario. Il secondo genotipo differiva per la costellazione IGC, con segmenti di origine pandemica (pdm09), mentre il terzo combinava una H3 di origine umana, una N2 derivata da Gent/84 e una IGC pdm09. Il presente studio è volto a descrivere le caratteristiche genetiche di questi nuovi H3huN2 e a valutarne la rilevanza epidemiologica, con implicazioni per la sorveglianza e il controllo, migliorando la preparazione e mitigando i rischi posti dai virus influenzali zoonotici.

**Abstract**

In recent years, the four main swine influenza A virus (IAV-S) subtypes circulating in swine in the EU have been H1avN1, H1huN2, H1N1pdm09, and H3N2. The latter emerged in 1984 from a reassortment event between a human seasonal H3N2 and H1avN1, and is currently detected at low prevalence in swine in Italy. Here, we describe 25 H3N2 IAV-S isolates belonging to three novel genotypes, first detected in Italy in 2021, likely resulting from reassortment events between swine and human IAVs. The first genotype was characterized by a hemagglutinin (H3 HA) of human seasonal origin, a neuraminidase (N2 NA) derived from H1huN2 strains circulating in Italian swine, and an avian-like internal gene cassette (IGC). The second genotype differed in its IGC constellation: PB2, PB1, PA and NP segments were of pandemic origin (pdm09), while NS and M segments derived from the Eurasian avian-like lineage. The third genotype combined a human-derived H3, a Gent/84-derived N2, and a pdm09-origin IGC, except for an avian-like NS. This study aimed to characterize the genetic features of these novel H3huN2 and assess their epidemiological relevance, with implications for surveillance and control, improving preparedness, and mitigating the risks posed by zoonotic influenza viruses.

## INTRODUZIONE

La produzione suinicola globale ha subito una crescita enorme negli ultimi due decenni, portando a cambiamenti strutturali profondi negli allevamenti, che hanno influenzato la dinamica delle infezioni da virus dell'influenza A suina (IAV-S). Si è passati da focolai epizootici respiratori acuti a forme enzootiche con circolazione ricorrente e persistente in molti allevamenti. A livello globale, i sottotipi endemici che circolano tra i suini includono H1N1, H1N2 e H3N2, ma la diversità genetica tra questi sottotipi è considerevole. In Europa, la variabilità genetica e antigenica degli IAV-S è aumentata significativamente a causa di continui eventi di riassortimento e dell'emergere di nuove varianti antigeniche. I sottotipi sono classificati in base alla combinazione dei geni dell'emoagglutinina (HA) e della neuraminidasi (NA), con le sequenze HA H1 suine categorizzate globalmente in distinte linee genetiche (Henritzi et al., 2020; Watson et al., 2015). Questa variabilità è alimentata da una trasmissione bidirezionale tra uomo e suino, che promuove l'adattamento virale specifico per l'ospite e la sua evoluzione (Anderson et al., 2021).

L'emergere del virus H1avN1 di tipo aviario eurasiatico (EA) nei suini europei risale al 1979. Successivamente, il virus H1N1pdm09, responsabile della pandemia globale del 2009, ha avuto un impatto significativo sulla popolazione suina europea dopo la trasmissione da uomo a suino, stabilendosi e riassortendosi con ceppi endemici per generare nuovi genotipi. Il sottotipo H1N2 di origine umana (H1huN2) è diventato sempre più comune in Europa, soprattutto dove la prevalenza di H3N2 è diminuita. Storicamente, i virus H3N2 hanno svolto un ruolo cruciale nell'epidemiologia dell'IAV-S in Europa. Sebbene fossero diffusi, la loro prevalenza è calata drasticamente in paesi come Regno Unito, Francia e Danimarca tra la fine degli anni '80 e l'inizio degli anni '90, forse per la pressione competitiva di altri sottotipi come H1huN2. Tuttavia, l'H3N2 continua a circolare in Germania, Italia, Spagna e Paesi Bassi, evidenziando variazioni regionali (Kuntz-Simon & Madec, 2009).

Gran parte della diversità osservata deriva dalla trasmissione reciproca tra uomo e suino, seguita da cambiamenti antigenici (*drift*) e diffusione tramite il commercio di animali vivi. Nel 1984, un riassortimento tra un virus H3N2 stagionale umano e il sottotipo H1avN1 ha portato al lineaggio genetico H3N2 derivato da A/swine/Gent/1/1984 (H3-1970.1, N2g), che si è diffuso ampiamente in Italia, tuttavia, la sua prevalenza è scesa sotto il 10% nel periodo 2020-2022. Questo lavoro presenta gli ultimi risultati sulla circolazione di un nuovo sottotipo (Soliani et al., 2025), identificato dopo il 2020 come nuovo lineaggio riassortante H3N2 in Italia, caratterizzato da un segmento HA di origine umana, che mostra una circolazione attiva e ulteriori riassortimenti.

## MATERIALI E METODI

Lo studio ha analizzato campioni clinici (fluidi orali, tamponi nasali, tessuti polmonari da necropsie) provenienti da focolai respiratori in allevamenti suini del Nord Italia, conferiti alle Sedi Territoriali dell'IZSLER tra gennaio 2021 e dicembre 2025. La positività allo IAV-S è stata determinata tramite RT-PCR real-time mirata al gene M, seguita da sottotipizzazione con *nested* RT-PCR. L'isolamento virale è stato tentato su colture cellulari MDCK e CACO-2 e su uova di pollo embrionate SPF di 11 giorni. Il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) è stato eseguito utilizzando la piattaforma Illumina MiSeq, con preparazione delle librerie tramite Nextera-XT DNA *Library Preparation Kit*. Le letture grezze sono state filtrate per qualità e assemblate de novo con CLC Genomic Workbench v.11.

Le analisi filogenetiche sono state condotte su un *dataset* di sequenze HA H3 e NA N2 umane e suine europee ottenute da GenBank (Chiapponi et al., 2021) con il *software*

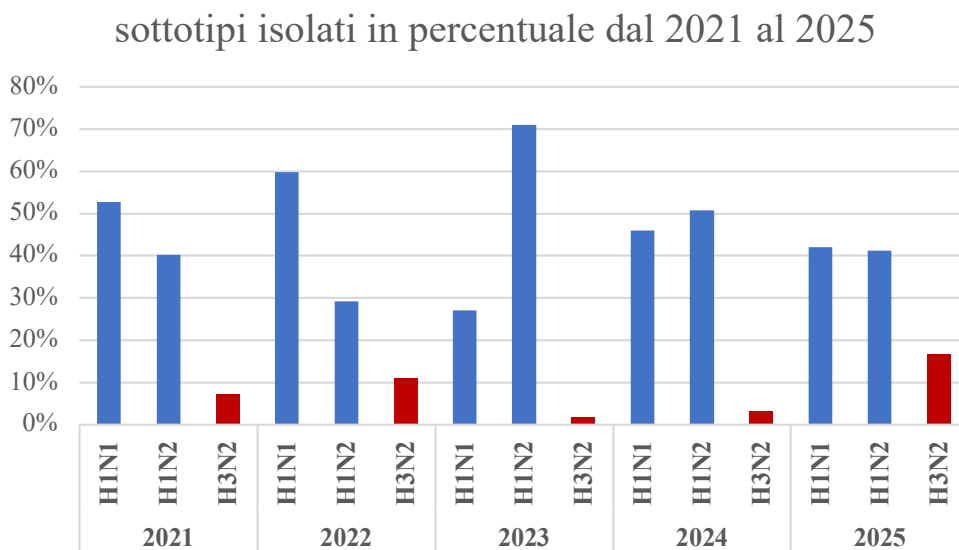
online IQ-TREE2 e costruzione di albero *Maximum-likelihood* (Minh et al., 2020) . Per la valutazione sierologica, sono stati eseguiti test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizzando globuli rossi di tacchino e il virus di riferimento A/swine/Italy/311349/2013 (H3 1970.1-N2g) con il relativo siero iperimmune suino (WOAH, 2023). Un totale di 88 sieri di campo, prelevati nel 2023 da animali vaccinati nei confronti dei principali sottotipi circolanti: H1AN1, H1BN2, H1CN1, H3N2, sono stati testati contro l'isolato della nuova linea A/swine/Italy/27326-07/2023 (Other-Human-2010) e il ceppo di riferimento italiano.

## RISULTATI

Tra gennaio 2021 e dicembre 2025, sono stati eseguiti 14035 test diagnostici in PCR da 9204 focolai in 1844 allevamenti. Sebbene la prevalenza di H3 HA sia rimasta inferiore rispetto ai sottotipi H1 (Figura 1), nel marzo 2025 si è registrato un incremento, raggiungendo il 17% degli episodi caratterizzati. Il sequenziamento di 44 ceppi H3N2 ha rivelato che 25 di essi presentano una HA appartenente al clade 'Other-Human-2010', strettamente correlata ai ceppi umani circolanti in Europa durante la stagione influenzale 2019-2020.

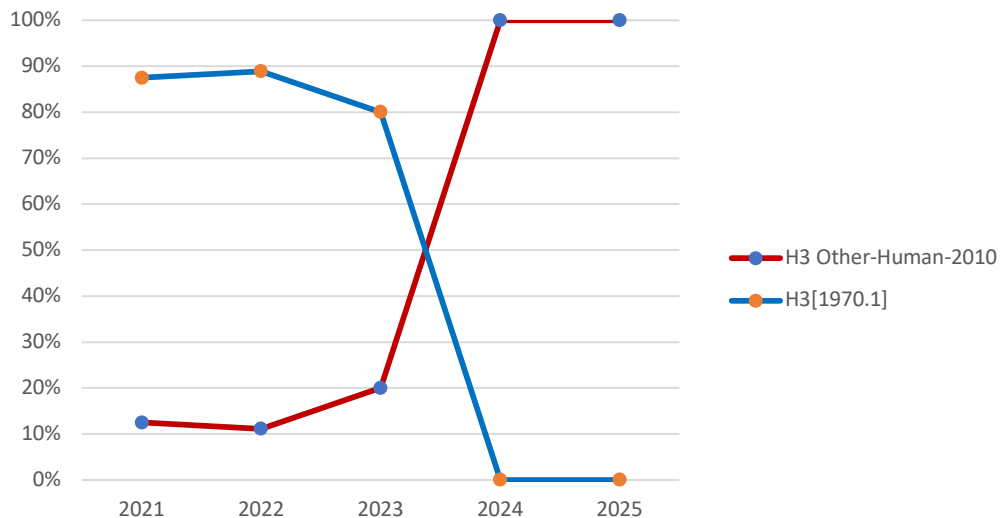
**Figura 1.** Sintesi dei sottotipi IAV-S rilevati da gennaio 2021 a marzo 2025.

**Figure 1.** Summary of IAV-S subtypes detected from January 2021 to March 2025.



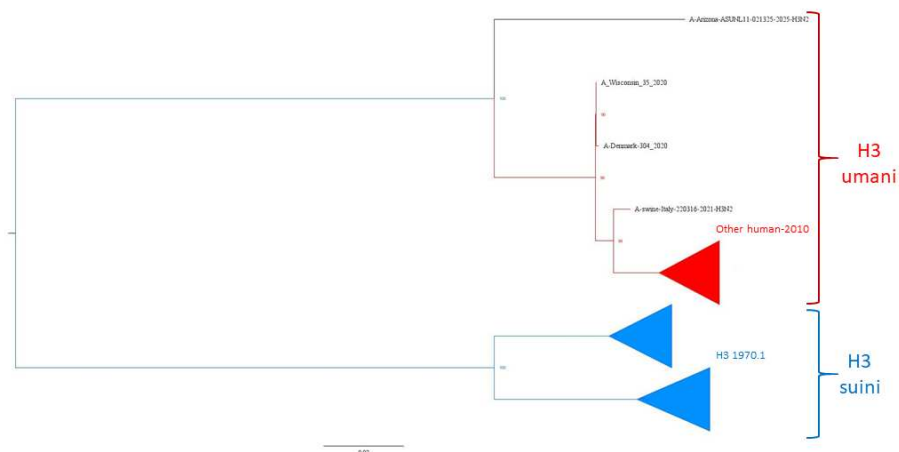
L'analisi mostra una fluttuazione della prevalenza di H3N2 che, partendo dal 3.1% nel 2021, è balzata al 17% nel corso del 2025. Inoltre, l'emoagglutinina di nuova introduzione, pare essere l'unica rilevata attualmente (Figura 2).

**Figura 2.** Sintesi dei sottotipi IAV-S rilevati da gennaio 2021 a marzo 2025.  
**Figure 2.** Summary of IAV-S subtypes detected from January 2021 to March 2025.



Dei 25 ceppi della nuova linea “*Other-Human-2010*”, 24 presentavano una neuraminidasi della linea It-N2, circolante nei suini italiani dal 2000 e uno solo un gene codificante per N2 circolante fra i ceppi H1N2 europei. I ceppi rilevati fino al 2023 possedevano una cassetta genica interna (IGC) di tipo aviario (EA), mentre nel 2024 e nel 2025 sono stati identificati 8 nuovi riassortanti con segmenti di origine pandemica (pdm09), appartenenti a ben due genotipi differenti.

**Figura 3.** Albero filogenetico del gene dell’emoagglutinina (H3 HA). In rosso sono raggruppate le sequenze suine appartenenti al *clade Other-Human-2010* e in azzurro quelle del *clade H31970.1*.  
**Figure 3.** Phylogenetic tree of the hemagglutinin (H3 HA) gene. The porcine sequences belonging to the *clade Other-Human-2010* are grouped in red, and those of *clade H31970.1* are grouped in blue.



Come illustrato nella Figura 3, l'analisi filogenetica conferma che i recenti isolati suini italiani si raggruppano in un cluster genetico che comprende le sequenze umane (in rosso), distinguendosi nettamente dai ceppi suini appartenenti al clade 1970.1 (in azzurro).

Le prove HI hanno confermato una marcata divergenza antigenica (Tabella 1). Il siero iperimmune contro il ceppo suino di riferimento ha mostrato un titolo di soli 1:20 contro il nuovo isolato di origine umana, a fronte di un titolo omologo di 1:640. Inoltre, l'86% dei sieri di animali vaccinati è risultato negativo (titolo <20) contro il nuovo ceppo "Other-Human-2010", mentre il 93% era positivo contro il ceppo suino classico. Solo il 7% dei sieri ha mostrato una bassa reattività verso il nuovo antigene, probabilmente dovuta a un'esposizione naturale sul campo.

**Tabella 1.** Risultati ottenuti testando 88 sieri di campo, prelevati da animali vaccinati per i tutti i sottotipi influenzali circolanti, contro il virus di riferimento appartenente al lineaggio 1970.1 e contro virus del più recente lineaggio *Other-Human-2010*.

**Table 1.** Results obtained by testing 88 field sera, taken from animals vaccinated for all circulating influenza subtypes, against the reference virus belonging to the 1970.1 lineage and against viruses of the most recent *Other-Human-2010* lineage.

Titolo HI verso H3N2 (1970.1)	Titolo HI verso H3N2 ( <i>Other-Human-2010</i> )	Wn. sieri di campo testati
>20	neg	80
40	40	1
640	20	1
80	80	1
neg	neg	1

La totalità di questi nuovi ceppi è stata localizzata in aree ad alta densità suinicola del Nord Italia (Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna e Veneto).

## DISCUSSIONE

I risultati documentano l'emergenza e la circolazione attiva di nove virus suini H3N2 riasortanti dotati di un segmento HA derivato da virus umani stagionali recenti. Questi virus combinano una HA umana (clade "Other-Human-2010") con segmenti NA e cassette geniche interne (IGC) già endemiche nella popolazione suina italiana, come la linea It-N2 introdotta originariamente dall'uomo alla fine degli anni '90. Tale costellazione genetica non era mai stata segnalata in precedenza in Italia. Non è ancora chiaro se questi virus derivino da molteplici eventi indipendenti di *spillover* o da un unico evento seguito da una circolazione sostenuta tra il 2022 e il 2025. Tale incertezza sottolinea l'importanza dell'applicazione di appropriate misure di biosicurezza interna e comportamenti adeguati del personale che lavora a stretto contatto con gli animali; l'adozione di dispositivi di protezione individuale (es: indossare mascherine chirurgiche/FFP2 in presenza di sintomi simil-influenzali) potrebbe risultare determinante nella tutela della sanità animale e della sanità pubblica. L'acquisizione di un'emoagglutinina di origine umana potrebbe offrire un vantaggio evolutivo significativo, permettendo al virus di evadere l'immunità preesistente nei suini, facilitando la diffusione in popolazioni immunologicamente *naïve*. Infatti, la mancanza di reazione crociata evidenziata dai test HI potrebbe presupporre una mancata protezione vaccinale ma, questo potrebbe essere valutato solo con prove di virus neutralizzazione che non sono eseguite di routine. Questo

vuoto immunitario potrebbe favorire la persistenza e l'ulteriore evoluzione di questo nuovo lineage. La rilevazione predominante in regioni ad alta densità suinicola sottolinea il legame critico tra l'allevamento intensivo e il rischio di riassortimento virale. L'interazione tra virus H1N2 circolanti e ceppi H3 umani evidenzia un "intreccio" complesso tra le popolazioni, dove lo scambio genetico continuo può portare all'adattamento di nuovi virus con potenziale zoonotico. La sorveglianza genomica deve essere integrata a livello di allevamento e di personale nelle produzioni intensive, poiché le infezioni miste con circolazioni di virus endemici in assenza di sintomatologia clinica possono facilmente passare inosservate.

## CONCLUSIONI

L'identificazione di questi nuovi genotipi H3N2, in attiva circolazione dal 2021, evidenzia il rischio persistente di trasmissione uomo-suino e i successivi eventi di riassortimento. I tre diversi genotipi identificati, caratterizzati da varie combinazioni di NA e IGC di origine suina e pandemica, dimostrano la plasticità genomica dell'IAV-S. Questi risultati sottolineano l'urgente necessità di una sorveglianza molecolare costante all'interfaccia uomo-animale per monitorare l'emergere di varianti che potrebbero avere implicazioni in ambito veterinario ma anche per la salute pubblica.

## FINANZIAMENTI

Lo studio è stato finanziato parzialmente da progetto ICRAD-PIGIE, da Ricerca Corrente PRC IZSLER 2020005 e PRC2026006.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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 Harbor Perspectives in Medicine*, *11*(3), a038737. doi: 10.1101/cshperspect.a038737. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038737>
2. 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*(1), 47. doi: 10.3390/v14010047. <https://doi.org/10.3390/v14010047>
3. 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., ... Harder, T. C. (2020). Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses. *Cell Host & Microbe*. [https://doi.org/S1931-3128\(20\)30402-9](https://doi.org/S1931-3128(20)30402-9) [pii]
4. Kuntz-Simon, G., & Madec, F. (2009). Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses and Public Health*, *56*(6-7), 310-325. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01236.x>
5. Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
6. Soliani, L., Mescoli, A., Zanni, I., Baioni, L., Alborali, G., Moreno, A., Faccini, S., Rosignoli, C., Lorenzi, G. De, Fiorentini, L., Torreggiani, C., Cordioli, B., Prosperi, A., Luppi, A., & Chiapponi, C. (2025). Human-Derived H3N2 Influenza A Viruses Detected

- in Pigs in Northern Italy. *Viruses*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/v17091171>
7. 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., Hjulager, C., Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Durrwald, R., Schlegel, M., Huovilainen, A., ... Kellam, P. (2015). Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *Journal of Virology*, 89(19), 9920–9931. <https://doi.org/10.1128/JVI.00840-15>
  8. WOA. (2023). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. In *Chapter 3.9.7. – Influenza A viruses of swine*. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.09.07\\_INF\\_A\\_SWINE.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.09.07_INF_A_SWINE.pdf)

# CASO CLINICO: RIDUZIONE DELL'INCIDENZA DI TUMEFAZIONI OMBELICALI MEDIANTE GESTIONE ATTIVA DEL CORDONE ALLA NASCITA

FAVARO D.<sup>1,2</sup>, MOSCON E.<sup>2</sup>, TONON F.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medico Veterinario Libero Professionista - SUIVET;

<sup>2</sup>Dipartimento MAPS, Università di Padova, Legnaro (PD).

## INTRODUZIONE

Le tumefazioni ombelicali del suino, definite in letteratura internazionale come umbilical outpouchings (UO), rappresentano una delle problematiche più frequenti e complesse osservate durante le prime fasi di vita e nel periodo di accrescimento. Sebbene nel linguaggio corrente vengano spesso assimilate alle ernie ombelicali, esse costituiscono in realtà un gruppo eterogeneo di lesioni che comprendono vere ernie con contenuto intestinale, raccolte ascessuali, protrusioni contenenti tessuto adiposo o strutture fibrose e alterazioni infiammatorie croniche della parete addominale. La natura composita di tali lesioni è stata chiaramente dimostrata da valutazioni macroscopiche e istopatologiche che evidenziano come una quota rilevante delle tumefazioni non corrisponda a un difetto erniario propriamente detto [1]. Dal punto di vista epidemiologico, le UO assumono un rilievo significativo sia per l'impatto sanitario sia per le ricadute economiche. In uno studio prospettico condotto su oltre 3000 suini danesi [2] è stata riportata una prevalenza dell'8,4%, evidenziando come più della metà dei soggetti affetti sia deceduta spontaneamente o sottoposta a eutanasia prima della macellazione. Lo stesso lavoro sottolinea come una parte consistente dei casi sia identificabile già nelle prime settimane di vita e come la dimensione della tumefazione e la presenza di lesioni cutanee sovrastanti rappresentino fattori prognostici determinanti. L'eziopatogenesi delle tumefazioni ombelicali è considerata multifattoriale. Studi longitudinali hanno evidenziato che alcune lesioni compaiono precocemente, talvolta già in sala parto, mentre altre possono svilupparsi successivamente o andare incontro a regressione spontanea [3]. Tali osservazioni suggeriscono un'interazione dinamica tra fattori legati al periodo neonatale, condizioni ambientali e caratteristiche individuali del suinetto. Tra le componenti predisponenti, la genetica riveste un ruolo di particolare interesse. La letteratura riporta una base ereditaria nelle ernie del suino, con ereditabilità moderata e possibile coinvolgimento di geni associati allo sviluppo della parete addominale e alla struttura del collagene [4]. Ciò implica che la suscettibilità individuale possa variare in funzione della linea genetica e che fattori ambientali o gestionali agiscano su una base predisponente. Nonostante l'ampia diffusione del problema, le strategie preventive hanno fornito risultati contrastanti. Un recente trial clinico controllato che ha valutato legatura, taglio e disinfezione del cordone ombelicale con clorexidina, associati a trattamento antinfiammatorio, non ha evidenziato una riduzione significativa dell'incidenza di UO rispetto a gruppi trattati con antibiotico sistemico o non trattati [5]. Questo dato suggerisce che la semplice gestione del cordone ombelicale possa non essere sufficiente, in condizioni standard, a modificare l'andamento epidemiologico della patologia. Alla luce di tali evidenze, risulta di particolare interesse l'osservazione di situazioni aziendali in cui modifiche gestionali apparentemente semplici si associano a variazioni marcate dell'incidenza clinica. Il presente lavoro descrive un caso aziendale in cui l'assistenza sistematica al parto, con taglio e disinfezione del cordone ombelicale lasciato a lunghezza controllata, è stata associata a una riduzione pressoché totale delle tumefazioni ombelicali. L'obiettivo è analizzare criticamente tale evidenza alla luce delle conoscenze attuali, discutendo le possibili interazioni tra fattori genetici, ambientali e gestionali.

## DESCRIZIONE DEL CASO

Lo studio osservazionale è stato condotto presso un allevamento suinicolo a ciclo aperto situato nella provincia di Treviso, dotato di circa 1300 scrofe in produzione, condotto a bande trisettimanali. La popolazione riproduttiva era costituita da differenti linee genetiche, distribuite come segue (dalle più anziane alle più giovani): 200 scrofe Goland Camborough L1050, 180 Goland Camborough 43 PIC Italia, 695 Goland Camborough PIC Italia, 160 R2 Nazionale ANAS e 65 Topigs linea Z Italia (GP). Negli anni precedenti l'allevatore aveva osservato un incremento progressivo dell'incidenza di tumefazioni ombelicali in concomitanza con la ristrutturazione della sala parto e la sostituzione delle gabbie tradizionali con box modello Welsafe (Evoteck S.r.l., Manerbio, Italia), dotati di sistema SWAP (Sow Welfare And Piglet Protection Pen). Con le gabbie tradizionali l'incidenza media riferita era compresa tra lo 0,2 e lo 0,3% per banda. Durante il periodo di sostituzione delle strutture e dopo il completo passaggio ai nuovi box, l'incidenza è aumentata stabilmente tra l'1,4% e il 2%, con ulteriore incremento stimato dello 0,5–0,7% segnalato nella fase di ingrasso dopo la consegna dei lattoni. I box Welsafe presentano una superficie complessiva di circa 7 m<sup>2</sup>. In configurazione chiusa la scrofa dispone di 1,32 m<sup>2</sup> mentre ai suinetti sono destinati 4,89 m<sup>2</sup>; una volta aperta la struttura, lo spazio a disposizione della scrofa aumenta a 4,74 m<sup>2</sup> e quello dei suinetti si riduce a 1,47 m<sup>2</sup>. Le strutture includono barre anti-schiacciamento orizzontali ancorate a parete e pavimento, poste posteriormente e lateralmente alla scrofa per consentire ai suinetti zone di fuga durante il decubito. La pavimentazione è in polipropilene con fessure non continue, sufficientemente ampie da permettere il passaggio delle deiezioni ma non tali da consentire l'incastro degli arti dei suinetti. Il microclima della sala parto è mantenuto a temperatura compatibile con il comfort della scrofa, mentre i suinetti dispongono di nido riscaldato con pavimento termico. A seguito dell'aumento di incidenza, l'allevatore aveva inizialmente ipotizzato una possibile influenza genetica. Sono stati pertanto modificati i verri utilizzati nelle linee Goland, passando dal seme C21 a Fomeva, senza osservare variazioni significative nell'incidenza delle tumefazioni. Analogamente, non sono state riscontrate differenze evidenti tra le diverse linee materne, inclusa la linea Topigs. Sulla base dell'esperienza diretta aziendale, non è emersa una correlazione evidente tra genetica paterna o materna e frequenza delle UO. È stata quindi formulata l'ipotesi che l'incremento fosse maggiormente correlato al nuovo assetto strutturale della sala parto. In particolare, si è ipotizzato che la maggiore disponibilità di spazio per i suinetti e la presenza di elementi metallici strutturali potessero favorire trazioni accidentali su cordoni ombelicali lasciati lunghi, con possibile sollecitazione meccanica dell'anello ombelicale nelle prime ore di vita. Nel quarto trimestre 2025 sono state monitorate quattro bande consecutive, ciascuna composta da circa 2000 suinetti venduti, per un totale di circa 8000 soggetti osservati. In tutte le bande è stata effettuata assistenza sistematica al parto con presenza continua dell'operatore. Per ciascun suinetto si è proceduto al taglio manuale del cordone ombelicale lasciando una lunghezza residua di circa 5 cm dalla parete addominale. Non è stata effettuata legatura sistematica. Nei casi in cui, dopo il taglio, si osservava una fuoriuscita ematica più evidente, il cordone veniva mantenuto temporaneamente compresso tra le dita fino a riduzione del sanguinamento. La durata della compressione variava in funzione dell'entità del sanguinamento osservato, poiché non tutti i cordoni presentavano la stessa intensità ematica al momento del taglio. Successivamente veniva applicata disinfezione topica mediante spray a base di rifaximina. Il monitoraggio delle tumefazioni ombelicali è stato effettuato attraverso osservazione clinica routinaria durante la permanenza in sala parto e nelle fasi successive, basandosi su stima visiva da parte dell'allevatore e del veterinario aziendale, senza applicazione di protocollo di misurazione standardizzato o palpazione sistematica programmata. Sono state considerate come UO tutte le tumefazioni visibili a livello ombelicale rilevate durante i controlli ordinari. Nelle quattro

bande osservate sono stati registrati complessivamente sei casi di tumefazione ombelicale: un caso nella prima, uno nella seconda, uno nella terza e tre casi nella quarta banda. L'incidenza complessiva è risultata pertanto pari a circa 0,075% (6/8000), valore nettamente inferiore rispetto alle incidenze storicamente riportate in azienda dopo l'introduzione dei nuovi box parto. Inoltre, successivamente al trasferimento dei lattoni, non sono pervenute ulteriori segnalazioni di comparsa di nuove tumefazioni ombelicali da parte dell'ingrassatore.

## **DISCUSSIONE**

Le tumefazioni ombelicali rappresentano una problematica complessa e multifattoriale, come evidenziato dalla letteratura recente. Studi prospettici danesi riportano prevalenze comprese tra il 4% e oltre l'8% [2,3], valori nettamente superiori rispetto allo 0,075% osservato nel presente contesto aziendale durante il periodo di monitoraggio. Il dato assume particolare rilevanza se confrontato con l'incidenza storica aziendale successiva all'introduzione dei box Welsafe, stabilmente compresa tra l'1,4% e il 2%, con ulteriore incremento segnalato nella fase di ingrasso. L'analisi delle possibili cause di tale incremento aveva inizialmente orientato l'attenzione verso una componente genetica. La letteratura riconosce una base ereditaria nelle ernie del suino, con ereditabilità moderata e possibile coinvolgimento di geni associati allo sviluppo della parete addominale e alla struttura del collagene [4]. Tuttavia, nell'esperienza aziendale descritta, la modifica dei verri utilizzati e l'assenza di differenze evidenti tra linee materne non hanno comportato variazioni apprezzabili dell'incidenza, rendendo meno probabile una spiegazione esclusivamente genetica del fenomeno osservato dopo il cambio strutturale. L'incremento temporale coincidente con la sostituzione delle gabbie tradizionali suggerisce un possibile ruolo dei fattori ambientali e strutturali. I box Welsafe offrono maggiore superficie disponibile e libertà di movimento rispetto alle gabbie tradizionali. Se da un lato tale configurazione risponde alle crescenti esigenze di benessere animale, dall'altro potrebbe modificare le dinamiche comportamentali e meccaniche nelle prime ore di vita del suinetto. In questo contesto, un cordone ombelicale lasciato lungo potrebbe essere più facilmente soggetto a trazioni accidentali, intrappolamento in elementi metallici o sollecitazioni dovute al movimento su ampie superfici grigliate. Sebbene tale ipotesi non sia stata formalmente testata, la coincidenza temporale tra cambio strutturale e aumento dell'incidenza rappresenta un elemento di interesse. La gestione attiva del cordone ombelicale applicata nel presente studio si differenzia parzialmente dai protocolli descritti in letteratura. Hansen et al. (2024), in un trial clinico controllato su larga scala, non hanno evidenziato differenze significative nell'incidenza di UO tra suinetti sottoposti a legatura, taglio e disinfezione con clorexidina rispetto a controlli o a trattamento antibiotico sistemico. Tuttavia, in quel contesto le condizioni strutturali e ambientali erano standardizzate e non caratterizzate da recenti modifiche potenzialmente impattanti sulle dinamiche neonatali. È possibile che l'efficacia di una gestione più attenta del cordone emerga solo in presenza di specifici fattori predisponenti ambientali. Un ulteriore elemento da considerare è la natura eterogenea delle UO. Le valutazioni macroscopiche e istopatologiche dimostrano che non tutte le tumefazioni corrispondono a veri difetti erniari, ma includono anche quadri infiammatori o raccolte ascessuali [1]. La riduzione osservata potrebbe quindi riflettere non solo una diminuzione di ernie vere, ma anche una minore incidenza di complicanze infiammatorie secondarie a contaminazione o microtraumi ombelicali. I limiti del presente lavoro devono essere chiaramente riconosciuti. L'osservazione non è stata condotta con disegno sperimentale controllato né con randomizzazione. Il monitoraggio delle tumefazioni si è basato su stima visiva routinaria e non su protocollo standardizzato con misurazione oggettiva. Inoltre, l'assenza di un gruppo di controllo interno impedisce di attribuire con certezza causale la riduzione osservata esclusivamente alla gestione del cordone. Non può

essere esclusa l'influenza di variabili stagionali, microclimatiche o gestionali concomitanti. Nonostante tali limiti, la marcata riduzione dell'incidenza rispetto ai dati storici aziendali suggerisce che, in specifici contesti strutturali caratterizzati da maggiore spazio e diversa configurazione delle gabbie parto, la lunghezza del cordone ombelicale e la sua gestione immediata possano rappresentare un fattore modulante del rischio. Alla luce dei futuri orientamenti normativi che prevedono un ampliamento degli spazi a disposizione delle scrofe in lattazione, appare opportuno considerare anche le possibili implicazioni indirette sulla salute neonatale del suinetto. Ulteriori studi controllati, condotti in allevamenti con differenti tipologie strutturali, sarebbero necessari per chiarire l'interazione tra genetica, ambiente e gestione del cordone ombelicale nella patogenesi delle tumefazioni ombelicali.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Hovmand-Hansen T, Jensen TB, Nielsen SS, et al. (2022) "Gross and histopathological evaluation of umbilical outpouchings in pigs". *Prev Vet Med.* 203. doi:10.1016/j.prevetmed.2022.105621
2. Hovmand-Hansen T, Nielsen SS, Jensen TB, Vestergaard K, Nielsen MBF, Jensen HE (2021) "Survival of pigs with different characteristics of umbilical outpouching in a prospective cohort study of Danish pigs". *Prev Vet Med.* 191. doi:10.1016/j.prevetmed.2021.105343
3. Hovmand-Hansen T, Jensen TB, Vestergaard K, Nielsen MBF, Leifsson PS, Jensen HE (2021) "Early risk factors, development, disappearance and contents of umbilical outpouching in Danish pigs". *Livest Sci.* 251. doi:10.1016/j.livsci.2021.104654
4. Nowacka-Wozzuk J (2021) "The genetic background of hernia in pigs: A review". *Livest Sci.* 244. doi:10.1016/j.livsci.2020.104317
5. Hansen ML, Larsen I, Jensen TB, Kristensen CS, Pedersen KS (2024) "Prevention of umbilical outpouchings and mortality in pigs: Meloxicam, tying, cutting, and chlorhexidine versus amoxicillin or no treatment? A clinical field trial". *Porcine Health Manag.* 10(1). doi:10.1186/s40813-024-00358-w

# CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI STREPTOCOCCUS SUIS SIEROTIPO 9 SEQUENCE TYPE 123: RIDOTTA SENSIBILITÀ AI BETA-LATTAMICI IN ITALIA E SPAGNA

## *GENOMIC CHARACTERIZATION OF STREPTOCOCCUS SUIS SEROTYPE 9 SEQUENCE TYPE 123 REVEALS EMERGING BETA-LACTAM REDUCED SUSCEPTIBILITY IN ITALY AND SPAIN*

MASSACCI F.R.<sup>1</sup>, CUCCO L.<sup>1</sup>, ALBINI E.<sup>1</sup>, RUSSO E.<sup>1</sup>, PIERSANTI F.<sup>1</sup>, CIUTI F.<sup>1</sup>, BRISCOLINI S.<sup>1</sup>, DILIO G.<sup>2</sup>, PANICCIÀ M.<sup>1</sup>, FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F.<sup>3</sup>, VELA A.I.<sup>3</sup>, PEZZOTTI G.<sup>1</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati",  
Via G. Salvemini 1, 06126 Perugia, Italia;

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
"Bruno Ubertini", Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia, Italy

<sup>3</sup> Department of Animal Health, Veterinary Faculty, Complutense University, Madrid, Spain

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, beta-lattamici, ST123, sierotipo 9

**Key Words:** *Streptococcus suis*, beta-lactams, ST123, serotype 9

### **Riassunto**

Una ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici è stata recentemente segnalata in *Streptococcus suis* sierotipo 9 (SS9), sierotipo dominante in Italia e Spagna. Il presente studio si propone di investigare la struttura di popolazione e la sensibilità ai  $\beta$ -lattamici in isolati SS9 provenienti da Italia e Spagna nel periodo compreso tra il 2002 e il 2024. Sono stati analizzati 166 isolati di SS9 ottenuti da casi clinici di streptococcosi nel suino. La sensibilità agli antibiotici è stata valutata mediante determinazione della concentrazione minima inibente (MIC). Al fine di definire il sequence type (ST), identificare la presenza di geni codificanti per la resistenza agli antibiotici e caratterizzare le sostituzioni nelle Penicillin Binding Proteins (PBP1A, PBP2B e PBP2X), tutti gli isolati sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma e analizzati mediante strumenti bioinformatici. Gli isolati appartenenti a ST16 (n = 19) sono risultati sensibili ai  $\beta$ -lattamici. La maggior parte degli isolati (61,4%; 102/166) apparteneva a ST123, senza evidenza di un chiaro clustering geografico. Oltre la metà di questi mostrava una ridotta sensibilità alla penicillina, con valori di MIC superiori a 1  $\mu$ g/ml rilevati esclusivamente dopo il 2017. Una ridotta sensibilità alla penicillina è stata inoltre osservata in isolati appartenenti a ST1953, ST94, ST1650 e a un nuovo ST. L'analisi filogenetica ha evidenziato un cluster principale comprendente gli isolati ST123 di entrambi i Paesi, senza netta distinzione geografica, suggerendo la diffusione di un lineage clonale condiviso nei due paesi. L'analisi delle Penicillin Binding Proteins (PBP1A, PBP2B, PBP2X) ha permesso di definire quattro stadi evolutivi, caratterizzati da un accumulo progressivo di sostituzioni aminoacidiche. Gli isolati con elevata resistenza alla penicillina (stadio 3), rilevati dal 2018 e appartenenti esclusivamente a ST123, presentavano un profilo mutazionale quasi completo e conservato nelle regioni transpeptidasiche di PBP2B e PBP2X, indicativo di una configurazione funzionale associata a elevati valori di MIC. Nel complesso, i risultati documentano un'evoluzione graduale della resistenza ai  $\beta$ -lattamici in SS9, sostenuta dall'espansione clonale di ST123, e sottolineano la necessità di una sorveglianza genomica continuativa nei sistemi suinicoli europei.

## Abstract

A reduced susceptibility to beta-lactams was recently reported in *Streptococcus suis* serotype 9 (SS9), a dominant serotype in Italy and Spain. This study aims at investigating the population structure and beta-lactams susceptibility in SS9 isolates from Italy and Spain from 2002 to 2024. One hundred sixty-six SS9 isolates from clinical cases of streptococcosis in pigs were analyzed. Antibiotic susceptibility was assessed using minimal inhibitory concentration (MIC). To assess the sequence type (ST), the presence of genes coding for antibiotic resistance and substitutions in the Penicillin Binding Protein (PBP) at the PBP1A, PBP2B and PBP2X, all the isolates were whole genome sequenced and analyzed using bioinformatics tools. ST16 (N=19) included susceptible isolates to beta-lactams. Most isolates (61.4%; 102/166) belonged to ST123, without clear geographical clustering. More than half of these isolates exhibited a reduced susceptibility to penicillin and MIC values exceeding 1 mcg/ml recorded exclusively after 2017. A reduced susceptibility to penicillin was also observed in ST1953, ST94, ST1650 and a new-ST. Phylogenetic analysis revealed a major cluster encompassing ST123 isolates from both countries, without clear geographical segregation, suggesting the dissemination of a shared clonal lineage across Italy and Spain. Analysis of the Penicillin Binding Proteins (PBP1A, PBP2B, and PBP2X) enabled the identification of four evolutionary stages characterized by the progressive accumulation of amino acid substitutions. Isolates exhibiting high-level resistance to penicillin (stage 3), detected from 2018 onwards and exclusively belonging to ST123, displayed an almost complete and conserved mutational profile within the transpeptidase domains of PBP2B and PBP2X, indicative of a functional configuration associated with elevated MIC values. Overall, these findings document the gradual evolution of beta-lactam resistance in SS9, driven by the clonal expansion of ST123, and highlight the need for continuous genomic surveillance within European swine production systems.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* rappresenta uno dei principali patogeni del suino a livello mondiale e, in ragione del suo potenziale zoonosico, costituisce anche una crescente preoccupazione per la salute pubblica (Zheng et al., 2018) serotype 9 strains isolated from a country where infection due to this serotype is endemic (Spain. Nel suino, *S. suis* è responsabile di meningite, setticemia, artrite ed endocardite, con rilevanti ripercussioni sul benessere animale e sulla produttività degli allevamenti (Zimmerman et al., 2019). Tra i sierotipi finora descritti, il sierotipo 2 (SS2) è stato storicamente il più frequentemente associato a malattia sia nel suino sia nell'uomo. Tuttavia, nell'ultimo decennio si è osservato un marcato incremento dell'incidenza di infezioni attribuibili al sierotipo 9 (SS9) in Europa e in Asia. In particolare, SS9 è divenuto il sierotipo predominante nei casi clinici in Italia e Spagna (Cucco et al., 2022; Uruén et al., 2022; Massacci et al., 2023; Vilaró et al., 2025).

La resistenza agli antimicrobici negli isolati di *S. suis* rappresenta una problematica sempre più rilevante. Gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, quali penicillina, ampicillina e ceftiofur, costituiscono tuttora la prima linea terapeutica per il trattamento delle infezioni da *S. suis* nel suino. I bersagli di questa classe di antibiotici sono le *Penicillin Binding Proteins* (PBPs), coinvolte nella biosintesi della parete cellulare batterica. I meccanismi di resistenza sono stati ampiamente studiati in *Streptococcus pneumoniae*, in cui il principale meccanismo è rappresentato da mutazioni nei siti attivi delle sequenze delle PBP, che determinano una riduzione dell'affinità di legame per i  $\beta$ -lattamici (Zapun et al., 2008; Dewé et al., 2019).

Studi genomici recenti hanno documentato una progressiva riduzione della sensibilità ai  $\beta$ -lattamici tra gli isolati SS9 provenienti da allevamenti suinicoli dell'Europa meridionale. In Italia è stato riportato un incremento dei valori di MIC per penicillina e ceftiofur, con

valori elevati significativamente associati a specifici *sequence types* (ST), tra cui ST123, ST1540 e ST1953 (Cucco et al., 2022; Massacci et al., 2023). Gli isolati con ridotta sensibilità presentavano sostituzioni aminoacidiche nelle PBP2B e PBP2X, note per influenzare l'affinità di legame ai  $\beta$ -lattamici. Analogamente, Uruén et al. (2022) hanno osservato una diffusa riduzione della sensibilità alla penicillina G (20–40% degli isolati) tra ceppi spagnoli di SS9, correlata a specifiche linee genomiche e all'origine geografica. Inoltre, analisi genomiche comparative condotte da Vilaró et al. (2025) hanno evidenziato una rapida espansione clonale di SS9 in Spagna, sostenuta da eventi di trasferimento genico orizzontale coinvolgenti determinanti di resistenza e geni codificanti per le PBP.

Alla luce della diffusione emergente di SS9 in Italia e Spagna e delle crescenti evidenze di ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici, risulta fondamentale caratterizzare in modo approfondito la popolazione, le dinamiche clonali e i profili di sensibilità ai  $\beta$ -lattamici degli isolati SS9 circolanti in questi due principali Paesi produttori di suini. Pertanto, il presente studio si propone di investigare la sensibilità ai  $\beta$ -lattamici degli isolati SS9 provenienti da Italia e Spagna nel periodo compreso tra il 2002 e il 2024 e di studiarne le sostituzioni aminoacidiche nelle PBP.

## **MATERIALI E METODI**

### **Isolati di *S. suis***

Sono stati analizzati 166 isolati di SS9 provenienti da casi clinici di streptococcosi nel suino (Tabella S1). Ottantuno isolati provenivano dalla Spagna ed erano stati raccolti tra il 2017 e il 2023, mentre 85 isolati sono stati isolati in Italia nel periodo 2002–2024. Una parte degli isolati italiani ( $n = 66$ ) era già stata analizzata in un nostro precedente studio (Massacci et al., 2023). Per evitare ridondanze, è stato incluso un solo isolato per anno e per allevamento. I campioni sono stati coltivati come precedentemente descritto (Cucco et al., 2022).

### **Test di sensibilità agli antimicrobici**

I valori di MIC sono stati determinati utilizzando un pannello MIC (BOP06F, Sensititre; Trek Diagnostic Systems Inc.) secondo le istruzioni del produttore. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 è stato utilizzato come ceppo di controllo di qualità. I valori di MIC sono stati interpretati secondo i breakpoint raccomandati dal Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) per *S. suis*, quando disponibili (CLSI, 2020). I criteri interpretativi per trimetoprim/sulfametossazolo e clindamicina sono stati quelli raccomandati per *S. pneumoniae* umano (CLSI, 2019).

### **Sequenziamento dell'intero genoma**

Per determinare il *sequence type* (ST), il profilo di virulenza e la presenza di geni codificanti per la resistenza agli antibiotici, 116 isolati SS9 sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma. Il DNA genomico degli isolati di *S. suis* è stato estratto mediante QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germania). Ogni campione è stato poi quantificato con il fluorimetro Qubit (Qubit™ DNA HS Assay, Thermo Fisher Scientific Inc.). Il DNA genomico è stato sequenziato su piattaforma Illumina MiSeq, generando *reads paired-end* da 150 bp.

### **Analisi bioinformatica**

Le reads Illumina sono state sottoposte a controllo di qualità mediante FastQC v0.12.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), assemblate con SPAdes v3.11.1 (Bankevich et al., 2012), valutate qualitativamente con QUAST v5.0.2 (Gurevich et al., 2013) e annotate con Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014). I file GFF generati da Prokka sono stati analizzati con Roary v3.11.3 (Page et al., 2015) per ottenere un allineamento del core genome utilizzato per costruire un albero filogenetico a massima verosimiglianza mediante FastTree v2.1.11 (Price et al., 2010). L'annotazione manuale dell'albero è stata eseguita con iTOL (v7.4.2).

Per confrontare i nostri isolati con quelli disponibili in letteratura, sono stati scaricati ulteriori genomi SS9 dalla Spagna dal database Sequence Read Archive (SRA). La collezione finale comprendeva 7 ulteriori genomi, precedentemente descritti da Massacci et al. (2023).

Le sequenze dei ceppi di *S. suis* sono state utilizzate per identificare il ST utilizzando *S. suis* MLST database (<https://pubmlst.org/ssuis/>), il profilo di virulenza mediante la ricerca dei geni di virulenza utilizzando BLASTN v2.13.0 (Camacho et al., 2009) e i geni di resistenza agli antimicrobici che sono stati analizzati con ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>). La resistenza ai beta-lattamici è stata studiata analizzando le mutazioni all'interno delle PBP (PBP1A, PBP2B e PBP2X). Le sequenze delle PBP dei 166 isolati sono state allineate manualmente con MUSCLE online (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle>) utilizzando *S. suis* P1/7 (GenBank GCA\_000091905.1) come riferimento, come descritto da Massacci et al. (2023)

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Le caratteristiche dei 166 isolati di *S. suis* sono riportate nella Tabella 1. Sono stati identificati 30 differenti ST, con ST123 e ST16 tra gli ST più diffusi, rappresentando rispettivamente il 61,4% (n = 102) e l'11,4% (n = 19) della collezione. Sono stati identificati nove nuovi ST (ST3171–ST3182). Tutti gli isolati ST16 (n = 19) erano sensibili ai  $\beta$ -lattamici.

La distribuzione degli isolati SS9 in base ai valori di MIC è riportata nella Tabella 2. La resistenza alla penicillina è stata osservata in isolati appartenenti a ST123 (n = 60), ST1953 (n = 2), ST94 (n = 1), ST1650 (n = 1) e ST3179 (n = 1). Gli isolati resistenti alla penicillina risultavano distribuiti in modo pressoché equivalente tra i due Paesi, con 29 isolati italiani e 31 spagnoli, suggerendo un carico comparabile di resistenza. Percentuali moderate di resistenza alla penicillina sono state riportate anche da Vilaró et al. (2025) in linea con precedenti studi condotti in Spagna, che documentavano livelli di resistenza compresi tra il 4% e il 32% (Vela et al., 2005; Petrocchi-Rilo et al., 2021; Uruén et al., 2022). Oltre il 75% (27/34) degli isolati resistenti alla penicillina nello studio di Vilaró et al. (2025) apparteneva al serotipo 9, ST123. Nei nostri isolati appartenenti al ST123, valori di MIC per la penicillina superiori a 1  $\mu$ g/ml sono stati registrati esclusivamente dopo il 2017.

Per quanto riguarda gli altri due  $\beta$ -lattamici, tutti gli isolati sono risultati pienamente sensibili al ceftiofur, sebbene la maggior parte (n = 87; 52,4%) presentasse valori di MIC moderati (0,5 mg/L) o elevati ( $\geq 1$  mg/L). Sono stati identificati due isolati resistenti all'ampicillina, entrambi di origine italiana e raccolti nel 2023 e 2024, appartenenti rispettivamente a ST123 e ST94 (Tabella 1). In accordo con quanto già riportato (Cucco et al., 2022), un'elevata percentuale di isolati risultava resistente alla clindamicina (143/166; 86,1%) e la quasi totalità degli isolati erano resistenti alla tetraciclina (165/166; 99,4%).

L'analisi filogenetica ha evidenziato un primo cluster comprendente tutti gli isolati ST123, includendo ceppi sia italiani sia spagnoli (Figura 1). Tale composizione geografica mista indica che il ST123 non è limitato a un singolo Paese e potrebbe rappresentare un lineage ampiamente circolante. All'interno di questo cluster, la maggior parte degli isolati mostrava resistenza fenotipica alla penicillina.

Al di fuori del cluster ST123, l'albero filogenetico mostra una notevole variabilità genetica. Gli isolati non si concentrano in un unico gruppo, ma si distribuiscono in diverse linee evolutive ben distinte, ciascuna corrispondente a uno specifico ST.

Inoltre, gli isolati italiani e spagnoli non formano gruppi separati tra loro, ma risultano mescolati nell'albero. Questo indica che non esistono cluster associati esclusivamente a uno dei due Paesi e conferma l'elevata diversità genetica presente all'interno di entrambe le collezioni.

Tuttavia, sono osservabili piccoli cluster costituiti esclusivamente da isolati di un singolo

Paese, suggerendo eventi di trasmissione locale o la persistenza temporale di specifiche linee. Ad esempio, ST1540 è stato rilevato esclusivamente in isolati italiani e mostrava un profilo di resistenza complesso, comprendente ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici, in particolare al ceftiofur.

La distribuzione dei geni di resistenza agli antimicrobici lungo l'albero filogenetico evidenzia *ermB* e *tetO* quali determinanti più frequentemente rilevati (Figura 1). La loro prevalenza è coerente con i dati di MIC, che indicano ridotta sensibilità rispettivamente a macrolidi e tetracicline.

Per chiarire i determinanti molecolari alla base della sensibilità ai  $\beta$ -lattamici, sono state analizzate le sostituzioni aminoacidiche nelle PBP. Gli isolati sono stati suddivisi in quattro differenti stadi evolutivi in base alla presenza di mutazioni nelle PBP (Tabella 3). Lo stadio 0 rappresenta la fase pre-evolutiva ed è caratterizzato da poche o assenti sostituzioni nelle PBP; tali isolati, appartenenti a diversi ST, mostravano bassi valori di MIC per tutti i  $\beta$ -lattamici testati ed erano equamente rappresentati in Italia e Spagna.

Gli isolati classificati nello stadio 1 presentavano un profilo alterato di PBP2X, comprendente sostituzioni quali I72T, L204P, S450T e T551S, in assenza di alterazioni complete in PBP1A e PBP2B. Questo stadio era associato a MIC elevate ( $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ ) per cefotaxime e ceftiofur,  $< 2$   $\mu\text{g/ml}$  per penicillina e  $< 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  per ampicillina. Gli isolati appartenevano a diversi ST ed erano presenti in entrambi i Paesi.

Nello stadio 2, il profilo alterato di PBP2X si associava a mutazioni in PBP1A (T685A + A699S/DEL + G723D). In questi isolati, i valori di MIC per l'ampicillina superavano  $0,5$   $\mu\text{g/ml}$ , mentre la penicillina rimaneva  $< 2$   $\mu\text{g/ml}$ . Gli isolati di stadio 2 appartenevano a differenti ST ed erano ampiamente distribuiti nel tempo, indicando la diffusione dell'adattamento associato a PBP1A.

Infine, gli isolati di stadio 3 erano caratterizzati da elevata resistenza alla penicillina ( $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ), frequentemente associata a valori elevati di MIC per le cefalosporine. Oltre all'allele di PBP1A osservato nello stadio 2, tali isolati presentavano una PBP2X ulteriormente modificata e un profilo mutazionale quasi completo e conservato in PBP2B. Le sostituzioni in PBP2B includevano I414V, Y432W/G433DEL, K479T e modificazioni nella regione D512–T515, localizzate nel dominio transpeptidasi. Residui 204, 450 e 551 e multiple posizioni nelle regioni catalitiche (627–636 e 678–680) risultavano frequentemente coinvolti. Gli isolati di stadio 3 appartenevano esclusivamente a ST123 ed erano rilevati in entrambi i Paesi, ma solo a partire dal 2018. La distribuzione delle mutazioni suggerisce una configurazione funzionale condivisa associata a elevati livelli di resistenza in Italia e Spagna. Le variazioni osservate in regioni non funzionali delle PBP non mostravano segregazione geografica, indicando acquisizioni ripetute all'interno di una linea altamente simile.

La distribuzione temporale degli isolati nei diversi stadi evolutivi (Figura 2) supporta un modello graduale di evoluzione della resistenza, caratterizzato dall'accumulo progressivo di alterazioni nelle PBP e dalla parallela espansione clonale di varianti altamente adattate, in un contesto di co-circolazione di genotipi meno evoluti.

Le sostituzioni di PBP1A riportate da Lunha et al. (2023) (P409T, S477D/G, M587S/T) non sono state rilevate nel nostro dataset. È stata invece identificata la sostituzione S695A in PBP1A, precedentemente associata a una significativa riduzione dell'affinità di legame per penicillina e amoxicillina (Peng et al., 2025). Tale mutazione era presente in due isolati spagnoli (2019 e 2023); tuttavia, solo l'isolato più recente (V3247) mostrava resistenza fenotipica alla penicillina, mentre l'altro (V3232) presentava bassi valori di MIC per penicillina, ceftiofur e ampicillina. Questo dato suggerisce che la sola sostituzione S695A non sia sufficiente a conferire resistenza e che siano necessarie ulteriori mutazioni o determinanti genetici per determinare il fenotipo resistente.

## CONCLUSIONE

Il presente studio fornisce una panoramica completa della popolazione e della sensibilità ai  $\beta$ -lattamici di isolati riferibili a *S. suis* sierotipo 9 circolante in Italia e Spagna nell'arco di oltre due decenni. La predominanza di ST123 e l'assenza di un clustering geografico indicano l'ampia diffusione di una linea clonale condivisa tra entrambi i Paesi. L'osservazione che la ridotta sensibilità alla penicillina sia emersa prevalentemente dopo il 2017 e risulti in larga parte concentrata all'interno di ST123 evidenzia la recente evoluzione e diffusione di questo fenotipo nel settore suinicolo europeo. Il riscontro, negli isolati ST123, delle medesime sostituzioni nelle PBP2B e PBP2X precedentemente associate a valori elevati di MIC per i  $\beta$ -lattamici rafforza ulteriormente il ruolo di tali sostituzioni nel determinare i profili di resistenza.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici in ST123 possa aver contribuito alla sua diffusione, favorendone l'affermazione come linea dominante nei sistemi di produzione suinicola sia in Italia sia in Spagna. Ulteriori approfondimenti genomici e una sorveglianza continua saranno essenziali per monitorare l'evoluzione della resistenza ai  $\beta$ -lattamici e per mitigare il suo potenziale impatto sulla salute animale e sull'efficacia terapeutica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
2. CLSI, 2020. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. *Clin. Lab. Stand. Inst. Suppl. VET01S* 5th ed.
3. CLSI, 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th ed. CLSI supplement M100. *Clin. Lab. Stand. Institute.*
4. Cucco, L., Panici , M., Massacci, F.R., Morelli, A., Ancora, M., Mangone, I., Di Pasquale, A., Luppi, A., Vio, D., Camm , 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
5. Dew , 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
6. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
7. Lunha, K., Chumpol, W., Jiemsup, S., Samngannim, S., Assavacheep, P., Yongkiettrakul, S., 2023. Relationship between Penicillin-Binding Proteins Alterations and  $\beta$ -Lactams Non-Susceptibility of Diseased Pig-Isolated *Streptococcus suis*. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* 12. doi:10.3390/antibiotics12010158
8. Massacci, F.R., Cucco, L., Panici , 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
9. 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

10. Peng, Z., Wang, J., Kang, S., Xu, S., Zhuang, H., Zhu, J., Yao, H., Zheng, H., Wu, Z., 2025. A single amino acid in PBP1a drives high-level penicillin and amoxicillin resistance in streptococcus suis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 66, 107604. doi:10.1016/j.ijantimicag.2025.107604
11. Petrocchi-Rilo, M., Martínez-Martínez, S., Aguarón-Turrientes, Á., Roca-Martínez, E., García-Iglesias, M.-J., Pérez-Fernández, E., González-Fernández, A., Herencia-Lagunar, E., Gutiérrez-Martín, C.-B., 2021. Anatomical Site, Typing, Virulence Gene Profiling, Antimicrobial Susceptibility and Resistance Genes of Streptococcus suis Isolates Recovered from Pigs in Spain. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* 10. doi:10.3390/antibiotics10060707
12. 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
13. Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
14. Uruén, C., García, C., Fraile, L., Tommassen, J., Arenas, J., 2022. How Streptococcus suis escapes antibiotic treatments. *Vet. Res.* 53, 91. doi:10.1186/s13567-022-01111-3
15. 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
16. Vilaró, A., Karstensen, K.T., Serra, L., Solé, E., Seró, I., Novell, E., Enrique-Tarancón, V., Cavaco, L.M., Gonzalez-Escalona, N., Mígura-Garcia, L., Fraile, L., 2025. New insights into the epidemiology of Streptococcus suis in pig production systems using whole genome sequencing. *Vet. Microbiol.* 301, 110376. doi:10.1016/j.vetmic.2025.110376
17. 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
18. 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
19. Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G., 2019. *Disease of Swine*, 11th ed. Wiley-Blackwell.

**Tabella 1.** Elenco dei ceppi analizzati nello studio.**Table 1.** List of strains analyzed in the study.

ID	Paese	Organo	Anno	Sierotipo	Sequence type	Profilo di virulenza
V3323	Spagna	Cervello	2017	9	ST123	mrp/sly
V3330	Spagna	Cervello	2018	9	ST123	mrp/sly
V3332	Spagna	Cervello	2018	9	ST16	mrp/sly
V3333	Spagna	Cervello	2018	9	ST16	mrp/sly
V3334	Spagna	Polmone	2018	9	ST123	mrp/sly
V3335	Spagna	Cervello	2018	9	ST16	sly
V3336	Spagna	Cervello	2018	9	ST123	mrp/sly
V3338	Spagna	Cervello	2018	9	ST16	sly
V3339	Spagna	Cuore	2018	9	ST123	sly
V3233	Spagna	Cervello	2020	9	ST123	mrp/sly
V3340	Spagna	Cervello	2018	9	ST123	sly
V3343	Spagna	Articolazione	2018	9	ST123	sly
V3320	Spagna	Cervello	2017	9	ST123	sly
V3324	Spagna	Cervello	2017	9	ST123	mrp/sly
V3387	Spagna	Sangue	2022	9	ST123	mrp/sly
V3342	Spagna	Cervello	2018	9	ST123	sly
V3379	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3344	Spagna	Cervello	2018	9	ST123	sly
V3348	Spagna	Articolazione	2018	9	ST1652	mrp/sly
V3231	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3349	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3350	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3351	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3352	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3353	Spagna	Articolazione	2019	9	ST123	mrp/sly
V3321	Spagna	Articolazione	2017	9	ST123	mrp/sly
V3354	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3359	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp
V3360	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3358	Spagna	Cervello	2019	9	ST2402	sly
V3386	Spagna	Articolazione	2022	9	ST2402	sly
V3357	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp
V3361	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3362	Spagna	Articolazione	2019	9	ST123	mrp/sly
V3363	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3364	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3322	Spagna	Cervello	2017	9	ST123	mrp/sly
V3365	Spagna	Cervello	2019	9	ST1650	sly
V3366	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	sly
V3367	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	sly
V3368	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	sly
V3369	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly

V3370	Spagna	Cervello	2019	9	ST1822	mrp/sly
V3371	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3372	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3374	Spagna	Cervello	2019	9	ST3171	mrp/sly
V3325	Spagna	Cervello	2017	9	ST16	mrp/sly
V3376	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3377	Spagna	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
V3378	Spagna	Cervello	2019	9	ST16	mrp/sly
V3232	Spagna	Cervello	2019	9	ST3172	mrp/sly
V3326	Spagna	Cervello	2017	9	ST123	mrp/sly
V3238	Spagna	Articolazione	2020	9	ST123	mrp/sly
V3235	Spagna	Cervello	2020	9	ST123	mrp/sly
V3236	Spagna	Cervello	2021	9	ST123	mrp/sly
V3327	Spagna	Articolazione	2018	9	ST123	mrp/sly
V3237	Spagna	Polmone	2021	9	ST123	mrp/sly
V3239	Spagna	Sangue	2021	9	ST123	mrp/sly
V3234	Spagna	Sangue	2021	9	ST123	mrp/sly
V3240	Spagna	Cervello	2022	9	ST3173	sly
V3388	Spagna	Sangue	2022	9	ST3173	mrp/sly
V3380	Spagna	Articolazione	2022	9	ST3173	mrp/sly
V3384	Spagna	Sangue	2022	9	ST3173	mrp/sly
V3382	Spagna	Cervello	2022	9	ST3177	mrp/epf
V3328	Spagna	Cervello	2018	9	ST123	mrp/sly
V3241	Spagna	Cervello	2022	9	ST2925	mrp/sly
V3242	Spagna	Articolazione	2022	9	ST3178	sly
V3383	Spagna	Cervello	2022	9	ST123	mrp/sly
V3385	Spagna	Cervello	2022	9	ST123	mrp/sly
V3243	Spagna	Articolazione	2022	9	ST123	sly
V3244	Spagna	Cervello	2022	9	ST123	sly
V3391	Spagna	Cervello	2022	9	ST123	sly
V3329	Spagna	Cervello	2018	9	ST123	mrp/sly
V3393	Spagna	Articolazione	2022	9	ST123	sly
V3246	Spagna	Cervello	2022	9	ST123	mrp/sly
V3245	Spagna	Cervello	2022	9	ST16	mrp/sly
V3396	Spagna	Cervello	2022	9	ST123	mrp/sly
V3398	Spagna	Cervello	2022	9	ST123	mrp/sly
V3247	Spagna	Cervello	2023	9	ST3179	mrp/sly
V3399	Spagna	Cervello	2023	9	ST3180	mrp/sly
V3400	Spagna	Cervello	2023	9	ST3181	mrp/sly
S684	Italia	Cervello	2022	9	ST123	mrp/sly
S694	Italia	Cervello	2022	9	ST1540	sly
S705	Italia	Cervello	2022	9	ST123	mrp/sly
S707	Italia	Cervello	2023	9	ST98	mrp/sly
S719	Italia	Cervello	2023	9	ST123	mrp/sly
S726	Italia	Articolazione	2023	9	ST123	mrp/sly

S772	Italia	Cervello	2023	9	ST123	mrp/sly
S786	Italia	Cervello	2023	9	ST16	mrp/sly
S789	Italia	Cervello	2023	9	ST123	mrp/sly
S790	Italia	Cervello	2024	9	ST94	mrp/sly
S798	Italia	Cervello	2024	9	ST16	mrp/sly
S960	Italia	Cervello	2024	9	ST123	sly
S1172	Italia	Cervello	2024	9	ST16	mrp/sly
S1177	Italia	Cervello	2024	9	ST123	mrp/sly
S1233	Italia	Cervello	2024	9	ST123	mrp/sly
V3206	Italia	Cervello	2024	9	ST123	mrp/sly/epf
V3450	Italia	Fegato	2024	9	ST805	sly
V3486	Italia	Cervello	2024	9	ST3182	mrp/sly
S129	Italia	Cervello	2017	9	ST123	mrp/sly
S136	Italia	ND	2017	9	ST1541	
S146	Italia	Cervello	2017	9	ST123	mrp/sly
S160	Italia	Spleen	2018	9	ST123	mrp/sly
S186	Italia	Spleen	2018	9	ST123	mrp/sly
S271	Italia	Cervello	2018	9	ST123	mrp/sly
S299	Italia	Cervello	2018	9	ST1540	
S300	Italia	Cervello	2018	9	ST1540	
S302	Italia	Cervello	2018	9	ST1540	
S306	Italia	Cervello	2018	9	ST123	mrp/sly
S309	Italia	Cervello	2018	9	ST123	mrp/sly
S313	Italia	Rene	2018	9	ST123	mrp/sly
S365	Italia	Fegato	2019	9	ST123	mrp/sly
S366	Italia	Cervello	2019	9	ST16	mrp/sly
S411	Italia	Cervello	2019	9	ST16	mrp/sly
S412	Italia	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
S425	Italia	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
S426	Italia	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
S427	Italia	Cervello	2019	9	ST123	
S430	Italia	Cervello	2019	9	ST94	mrp/sly
S434	Italia	Cervello	2019	9	ST16	mrp/sly
S435	Italia	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
S436	Italia	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
S437	Italia	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
S438	Italia	Cervello	2019	9	ST123	mrp/sly
S443	Italia	Cervello	2020	9	ST123	mrp/sly
S447	Italia	Cervello	2020	9	ST1540	mrp/sly
S456	Italia	Cervello	2020	9	ST123	mrp/sly
S475	Italia	Articolazione	2020	9	ST1953	mrp/sly
S485	Italia	Cervello	2020	9	ST1953	mrp/sly
S494	Italia	Cervello	2020	9	ST123	mrp/sly
S499	Italia	Polmone	2004	9	ST94	mrp/sly
S500	Italia	Fegato	2008	9	ST1954	mrp/sly/epf

S502	Italia	Polmone	2003	9	ST16	mrp/sly
S503	Italia	Cervello	2004	9	ST16	mrp/sly
S504	Italia	Cervello	2004	9	ST123	mrp/sly
S511	Italia	Cervello	2020	9	ST123	mrp/sly
S524	Italia	Cervello	2020	9	ST124	mrp/sly
S528	Italia	Cervello	2020	9	ST16	mrp/sly
S530	Italia	Cervello	2020	9	ST1546	mrp/sly
S531	Italia	Cervello	2020	9	ST1955	mrp/sly
S533	Italia	Cervello	2020	9	ST123	mrp/sly
S547	Italia	Cervello	2021	9	ST1540	mrp/sly
S550	Italia	Fegato	2021	9	ST123	
S551	Italia	Cervello	2021	9	ST1540	
S567	Italia	ND	2002	9	ST123	mrp/sly
S568	Italia	Polmone	2003	9	ST123	mrp/sly
S569	Italia	Cervello	2010	9	ST123	mrp/sly
S572	Italia	Cervello	2013	9	ST123	mrp/sly
S573	Italia	Cervello	2008	9	ST123	mrp/sly
S575	Italia	ND	2010	9	ST123	mrp/sly
S577	Italia	Polmone	2012	9	ST123	mrp/sly
S578	Italia	Polmone	2002	9	ST17	mrp/sly
S579	Italia	Cervello	2005	9	ST16	mrp/sly
S580	Italia	Polmone	2002	9	ST1956	
S581	Italia	Polmone	2008	9	ST123	mrp/sly
S582	Italia	Cervello	2013	9	ST136	mrp/sly
S584	Italia	Fegato	2008	9	ST1957	mrp/sly
S585	Italia	Polmone	2003	9	ST1956	
S590	Italia	ND	2020	9	ST123	mrp/sly
S593	Italia	ND	2021	9	ST123	mrp/sly
S596	Italia	Cervello	2021	9	ST123	mrp/sly
S597	Italia	Cervello	2021	9	ST16	mrp/sly
S599	Italia	Cervello	2021	9	ST16	mrp/sly
S600	Italia	Cervello	2019	9	ST94	mrp/sly
S601	Italia	Pericardio	2020	9	ST94	mrp/sly
S602	Italia	Fegato	2021	9	ST94	mrp/sly

ND: non determinato

**Tabella 2.** Distribuzione dei valori di MIC tra i 166 isolati di *S. suis* provenienti da suini malati collezionati in Italia e Spagna nel periodo 2002–2024. L’area in grigio rappresenta il range di concentrazioni testate per ciascun antibiotico. Le linee verticali indicano la soglia per la resistenza secondo quanto indicato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (<https://clsi.org>). Tra parentesi sono indicate le percentuali.

**Table 2.** Distribution of MICs among 166 *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs collected in Italy and Spain 2002–2024. Gray shading indicates range of values actually tested for each antibiotic. Black vertical bars indicate threshold values for clinical resistance, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (<https://clsi.org>). Percentages are shown in brackets.

Antibiotic	MIC values (mg/L)												
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Ceftiofur		79 (47.6)	41 (24.7)	40 (24.1)	6 (3.6)								
Penicillin G	57 (34.3)	15 (9.1)	29 (17.5)	56 (33.7)	7 (4.2)	1 (0.6)	1 (0.6)						
Ampicillin		138 (83.2)	16 (9.6)	10 (6)	2 (1.2)								
Enrofloxacin	2 (1.2)	21 (12.6)	68 (41)	73 (44)	1 (0.6)	1 (0.6)							
Tetracycline				1 (0.6)	2 (1.2)	1 (0.6)		162 (97.6)					
Florfenicol		1 (0.6)	2 (1.2)	61 (36.8)	101 (60.8)		1 (0.6)						
Trimethoprim/sulfamethoxazole*			134 (89.3)	2 (1.3)		5 (3.4)	9 (6)						
Clydamycin**		16 (10)	1 (0.6)	1 (0.6)					142 (88.8)				
Tylosin***			11 (7)	2 (1.3)						145 (91.7)			

\* Sixteen isolates were not determined

\*\* Six isolates were not determined

\*\*\* Eight isolates were not determined

**Tabella 3.** Distribuzione delle sostituzioni a livello delle PBP nei 166 isolati di *S. suis*.  
**Table 3.** Distribution of PBP substitutions in 166 *S. suis* isolates.

ID	ST	Stage	MIC pen	MIC amp	MIC cef	Profilo PBP1A	Profilo PBP2X	Profilo PBP2B
S1172	ST16	0	<=0,12	<=0,25	<=0,25		L32F, I72T, D136A, M139N, K172E, L204P, V205I, D269N, A359E, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, D125A, E131T, I414V, M690DEL
S1177	ST123	0	1	<=0,25	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S1233	ST123	0	1	<=0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S129	ST123	1	0,5	0,12	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S136	ST1541	1	0,12	0,12	1	N264T, V452I, N455D, K518Q, K521Q, S574A	I72T, D136A, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, A359E, Y382Q, Y389F, T402I, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, Q453H, A460V, T467S, D486N, T489S, T491S, A492V, V494I/L, S495A, S496T, V500I, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, S556G, N595S, R600N, D601T, V603I, S621A, A625S, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, I641T, Q655E/Y, K669R, V673L, G676D, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, E694D/T, K720E	L18F, P92S, A104P, K143E, N179S, S206A/V, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415L, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S146	ST123	0	0,5	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S160	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S186	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S271	ST123	1	0,12	0,12	1	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S299	ST1540	1	0,25	0,12	1	T245P, A361S	I72T, D136A, L204P, I236L/V, K251N/T, E253K, T254Q, V257I, N284T, K286R, A380E, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494I/L, S496T, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, R628Q/Y	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, V408I, I414V, Q415L, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G

S300	ST1540	1	0,25	0,12	1	T245P, A361S	I72T, D136A, L204P, I236L/V, K251N/T, E253K, T254Q, V257I, N284T, K286R, A380E, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494I/L, S496I, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, R628Q/Y	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, V408I, I414V, Q415L, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G
S302	ST1540	1	0,25	0,12	2	T245P, A361S	I72T, D136A, L204P, I236L/V, K251N/T, E253K, T254Q, V257I, N284T, K286R, A380E, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494I/L, S496I, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, R628Q/Y	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, V408I, I414V, Q415L, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G
S306	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S309	ST123	2	1	1	2	T606P, T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S313	ST123	3	2	1	1	T606P, T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S365	ST123	3	2	0,12	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N, M690DEL, N691DEL/Y
S366	ST16	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S411	ST16	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S412	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S425	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S426	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S427	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S430	ST94	1	0,25	0,12	2	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, Y382Q, Y389F, Q407E, T418A, F422Y, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, N595S, R600N, D601T, S621A, A625S, A627T/S, R628Q/Y, N631K/T, Q636K/T/R, L640I, I641T, S648T, Q655E/Y, Q658H, V660I, A666S/T, K670N, V671A, S677I, K678A/L/N, I680A, D707G, F709I/L, K720E	R19C, I414V
S434	ST16	0	0,12	0,12	0,25		P2S, I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V

S435	ST123	2	1	1	2	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236I/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S436	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S437	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S438	ST123	0	1	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S443	ST123	2	1	0,5	1	S508N, T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236I/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S447	ST1540	0	0,12	0,12	0,5	T245P, A361S	I72T, D136A, L204P, I236L/V, K251N/T, E253K, T254Q, V257I, N284T, K286R, A380E, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494I/L, S496I, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, R628Q/Y	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G
S456	ST123	0	0,25	0,12	0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S475	ST1953	2	1	0,5	2	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236I/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S485	ST1953	2	1	1	1	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236I/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S494	ST123	0	1	0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N

S499	ST94	0	0,12	0,12	0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, I414V
S500	ST1954	0	0,12	0,12	0,25			
S502	ST16	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S503	ST16	0	0,12	0,12	0,25		P2S, I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S504	ST123	0	0,5	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, P190S, L204P, H212Y, D269N, S450T, D486N, T551S, I568T, R628Q/Y, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
S511	ST123	2	1	1	2	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494L/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S524	ST124	1	0,12	0,12	1	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494L/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S528	ST16	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S530	ST1546	0	0,12	0,12	0,25	R118H	R69Q, I72T, L204P, A468S, R628Q/Y	K143E, I414V
S531	ST1955	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S533	ST123	0	1	0,12	0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S547	ST1540	0	0,5	0,12	0,25	T245P, A361S	I72T, D136A, L204P, I236L/V, K251N/T, E253K, T254Q, V257I, N284T, K286R, A380E, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494L/L, S496T, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, R628Q/Y	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G
S550	ST123	1	0,25	0,12	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S551	ST1540	1	0,5	0,12	1	T245P, A361S	I72T, D136A, L204P, I236L/V, K251N/T, E253K, T254Q, V257I, N284T, K286R, A380E, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494L/L, S496T, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, R628Q/Y	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G
S567	ST123	0	0,12	0,12	0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, P190S, L204P, H212Y, D269N, S450T, D486N, T551S, I568T, R628Q/Y, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
S568	ST123	0	0,12	0,12	0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, P190S, L204P, H212Y, D269N, S450T, D486N, T551S, I568T, R628Q/Y, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
S569	ST123	0	0,5	0,12	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494L/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N

S572	ST123	0	0,5	0,12	0,5	T685A, A699S/ DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, P190S, L204P, H212Y, D269N, S450T, D486N, T551S, I568T, R628Q/Y, K678A/L/N	R19C, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, I428L, Y432W, G433DEL, A468P, Y471F, T477A, K479T, S497P, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A
S573	ST123	2	0,5	0,5	1	T685A, A699S/ DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494L/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S575	ST123	2	1	1	1	T685A, A699S/ DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494L/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S577	ST123	0	0,5	0,12	0,25	T685A, A699S/ DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, P190S, L204P, H212Y, D269N, S450T, D486N, T551S, I568T, R628Q/Y, K678A/L/N	R19C, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, I428L, Y432W, G433DEL, A468P, Y471F, T477A, K479T, S497P, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A
S578	ST17	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S579	ST16	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S580	ST1956	0	0,12	0,12	0,25	D197N	I72T, D136A, K172E, L204P, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S581	ST123	0	0,5	0,12	0,25	T685A, A699S/ DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S582	ST136	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S584	ST1957	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S585	ST1956	0	0,12	0,12	0,25	D197N	I72T, D136A, K172E, L204P, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S590	ST123	0	1	0,25	0,25	T685A, A699S/ DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S593	ST123	0	1	0,25	0,25	T685A, A699S/ DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S596	ST123	0	0,5	0,25	0,25	T685A, A699S/ DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S597	ST16	0	0,12	0,12	0,25		P2S, I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S599	ST16	0	0,12	0,12	0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S600	ST94	1	0,12	0,12	1	T685A, A699S/ DEL, G723D	I72T, L204P, Y382Q, Y389F, Q407E, T418A, F422Y, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494L/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, N595S, R600N, D601T, S621A, A625S, A627T/S, R628Q/Y, N631K/T, Q636K/T/R, L640I, I641T, S648T, Q655E/Y, Q658H, V660I, A666S/T, K670N, V671A, S677T, K678A/L/N, I680A, D707G, F709I/L, K720E	R19C, I414V

S601	ST94	1	0,12	0,12	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, Y382Q, Y389F, Q407E, T418A, F422Y, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, N595S, R600N, D601T, S621A, A625S, A627T/S, R628Q/Y, N631K/T, Q636K/T/R, L640I, I641T, S648T, Q655E/Y, Q658H, V660I, A666S/T, K670N, V671A, S677T, K678A/L/N, I680A, D707G, F709L/L, K720E	R19C, I414V
S602	ST94	1	1	0,12	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, Y382Q, Y389F, Q407E, T418A, F422Y, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, N595S, R600N, D601T, S621A, A625S, A627T/S, R628Q/Y, N631K/T, Q636K/T/R, L640I, I641T, S648T, Q655E/Y, Q658H, V660I, A666S/T, K670N, V671A, S677T, K678A/L/N, I680A, D707G, F709L/L, K720E	R19C, N179S, S206A/V, P234L, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415L, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S684	ST123	0	1	<=0,25	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S694	ST1540	2	0,5	1	<=0,25	T245P, A361S	I72T, D136A, L204P, I236L/V, K251N/T, E253K, T254Q, V257I, N284T, K286R, A380E, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494I/L, S496T, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, R628Q/Y	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, V408I, I414V, Q415L, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, A539V, I542V, T547K, A562D/E/R, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G
S705	ST123	0	0,5	<=0,25	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S707	ST98	0	<=0,12	<=0,25	<=0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S719	ST123	0	1	<=0,25	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S726	ST123	0	1	<=0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S772	ST123	0	1	<=0,25	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S786	ST16	0	<=0,12	<=0,25	<=0,25		P2S, I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S789	ST123	2	1	2	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
S790	ST94	2	0,5	2	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, Y382Q, Y389F, Q407E, T418A, F422Y, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, N595S, R600N, D601T, S621A, A625S, A627T/S, R628Q/Y, N631K/T, Q636K/T/R, L640I, I641T, S648T, Q655E/Y, Q658H, V660I, A666S/T, K670N, V671A, S677T, K678A/L/N, I680A, D707G, F709L/L, K720E	R19C, N179S, S206A/V, P234L, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415L, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
S798	ST16	0	<=0,12	<=0,25	<=0,25		P2S, I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
S960	ST123	0	1	<=0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3206	ST123	0	0,5	<=0,25	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N

V3231	ST123	2	1	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236I/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3232	ST3172	0	0,12	<0,25	<0,25	E443A, A489T, T685A, S695A	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, K678A/L/N	I300V, R332K, I414V, A442V
V3233	ST123	0	0,25	<0,25	0,5	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, K479T, D512E, K513E, T515S
V3234	ST123	0	0,5	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3235	ST123	0	1	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3236	ST123	0	<0,12	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, R288K, E333D, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
V3237	ST123	0	1	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3238	ST123	0	0,5	<0,25	1	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236I/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3239	ST123	0	0,5	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3240	ST3173	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
V3241	ST2925	0	<0,12	<0,25	<0,25	N264T, P405T, A439T, N455D, K518Q, K521Q, A699S/DEL	L32F, I72T, L204P, L387F, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	I414V, A523S
V3242	ST3178	0	0,5	<0,25	<0,25	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, T625R, K674N
V3243	ST123	3	4	0,5	0,5	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, K479T, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3244	ST123	3	8	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701I/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3245	ST16	0	<0,12	<0,25	<0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V

V3246	ST123	0	1	<0,25	1	S73N, E77K, F129L, N221S, N264T, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, Y382Q, M437L, S445T, S450T, L463I, A468S, I474V, T491S, V494I/L, S496T, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, I568T, A627T/S, K678A/L/N	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3247	ST3179	0	1	<0,25	0,5	V251I, S695A, T698DEL, A699S/DEL, T700DEL, E701DEL, T707A	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	L18F, P92S, K143E, N179S, S206A/V, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G, Q668E, S669N, T671DEL, T675A, Q678T, Q685N/H, H688Y
V3320	ST123	2	0,5	0,5	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3321	ST123	2	1	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	P2S, K7R, K14R, K15R, S20T, R24Q, R25K, S29N, V37I, I43S, Y47L, F55A, D58S, R69Q, I72T, K76R, V97I, E104D, L109F, K111E, Q116E, S117A, S118T, F127L, K128N, H130Y, M139N, E140Q, A173T, E177K, L204P, L220M, I236I/V, K251N/T, T254Q, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, Y361F, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, N569K, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	P8S, N63T, I66V, Q74K, K76T, E82Q, P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3322	ST123	0	0,5	<0,25	<0,25	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	R19C, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, A364T, I414V, Y432W, G433DEL, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, T625R, K674N
V3323	ST123	0	1	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3324	ST123	2	1	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3325	ST16	0	<0,12	<0,25	0,5		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
V3326	ST123	2	0,5	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3327	ST123	2	1	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N

V3328	ST123	2	1	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3329	ST123	0	1	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3330	ST123	3	2	<0,25	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I43S, I72T, L204P, L220M, I236L/V, K251N/T, T254Q, N284T, R288K, Q321A, Y382Q, Y389F, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, S556G, Q560L, I563T, I568T, N595S, R600N, D601T, R628Q/Y	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3332	ST16	0	<0,12	<0,25	<0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
V3333	ST16	0	<0,12	<0,25	<0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
V3334	ST123	0	1	<0,25	1	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N364S, V367T, L378V, Y382Q, S383E, Y389F, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, S556G, Q560L, I563T, I568T, N595S, R600N, D601T, S621A, P624S, A625S, A627T/S, R628Q/Y, V629L, A630E/G/T, Q636K/T/R, L640I, I641T, S648T, Q655E/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, A364T, I414V, Y432W, G433DEL, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, T625R, K674N
V3335	ST16	0	<0,12	<0,25	<0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
V3336	ST123	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
V3338	ST16	0	<0,12	<0,25	<0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
V3339	ST123	0	0,25	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627T/S, M706L	R19C, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3340	ST123	0	0,25	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, P190S, L204P, H212Y, T418A, S450T, D486N, T551S, S556G, Q560L, I568T, N595S, R600N, D601T, A627T/S, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
V3342	ST123	3	2	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3343	ST123	3	2	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3344	ST123	3	2	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3348	ST1652	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V

V3349	ST123	2	0,5	0,5	1	T685A, A699S/ DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3350	ST123	0	0,5	<0,25	0,5	T685A, A699S/ DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, V205I, H212Y, S450T, A468S, D486N, Y525F, D541E, V547M, T551S, I568T, A627T/S, R628Q/Y	R19C, E131T, R135K, A140K, K146L, S155E, S157A, S161A, D165E, I167L, P168S, A169E, E170D, A171V, Q173N, D178E, K180Q, T192A, S195A, T203S, T205S, S206A/V, T231N, I240V, S266P, Q291E, I300V, E304K, R332K, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, T625R, K674N
V3351	ST123	2	0,5	0,5	1	T685A, A699S/ DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3352	ST123	0	1	<0,25	0,5	T685A, A699S/ DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, K143E, N179S, S206A/V, T231N, I240V, S266P, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G, Q668E, S669N, T671DEL, T675A, Q678T, Q685N/H, H688Y
V3353	ST123	0	0,5	<0,25	<0,25	T685A, A699S/ DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3354	ST123	0	<0,12	<0,25	0,5	T685A, A699S/ DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3357	ST123	0	1	<0,25	<0,25	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	R19C, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, A364T, I414V, Y432W, G433DEL, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, T625R, K674N
V3358	ST2402	0	0,25	<0,25	1	P405T, N455D, K518Q, K521Q, M617I, S671Y, T685A, T688P, A699S/DEL	I72T, L204P, A468S, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, N595S, R600N, D601T, V603I, S621A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E632Q, E634D, Q636K/T/R, L637M, Q655E/Y, K670N, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, E711K, K720E	P92S, K143E, N179S, S206A/V, T231N, I240V, S266P, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G, Q668E, S669N, T671DEL, T675A, Q678T, Q685N/H, H688Y
V3359	ST123	2	1	1	1	T685A, A699S/ DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N

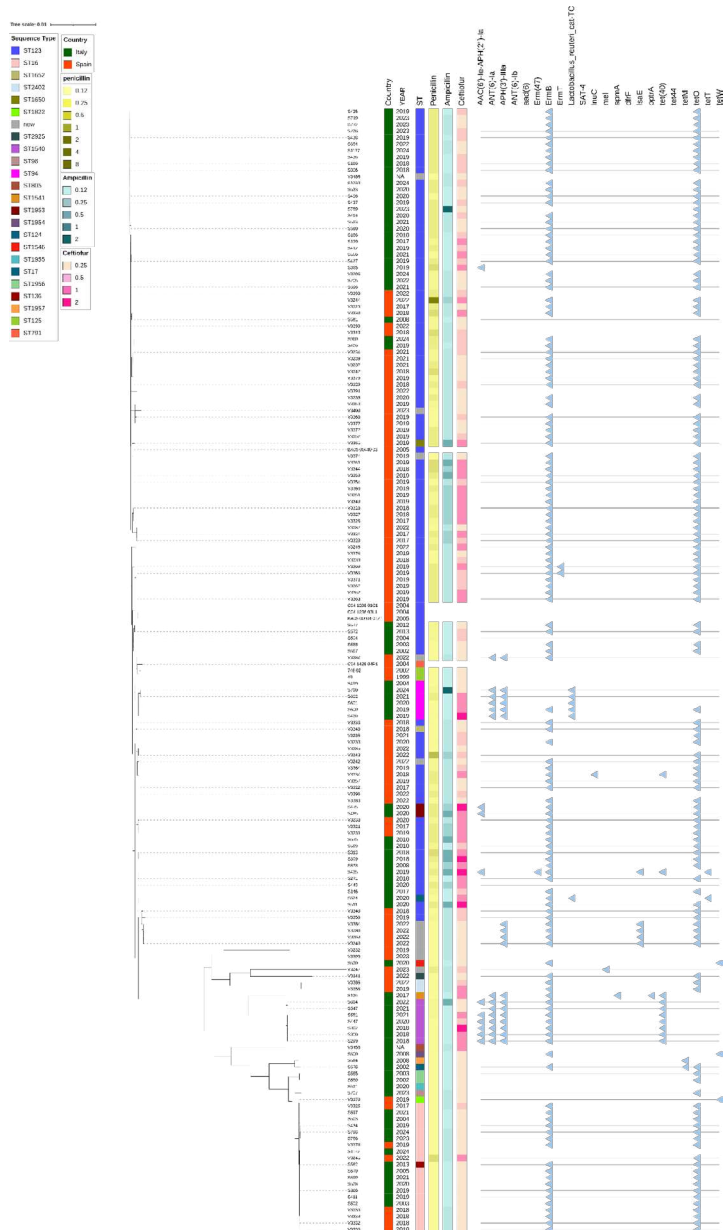
V3360	ST123	2	1	0,5	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3361	ST123	3	2	1	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3362	ST123	0	1	<0,25	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627I/S, M706L	P92S, K143E, N179S, S206A/V, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3363	ST123	0	1	<0,25	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627I/S, M706L	P92S, K143E, N179S, S206A/V, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3364	ST123	0	0,5	<0,25	0,5	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	R19C, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, A364T, I414V, Y432W, G433DEL, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, T625R, K674N
V3365	ST1650	2	1	1	1	T685A, A699S/DEL, G723D	V18I, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3366	ST123	0	1	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627I/S, M706L	P92S, K143E, N179S, S206A/V, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3367	ST123	0	1	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627I/S, M706L	P92S, K143E, N179S, S206A/V, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3368	ST123	0	<0,12	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	K143E, I414V
V3369	ST123	0	1	<0,25	1	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627I/S, M706L	P92S, K143E, N179S, S206A/V, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3370	ST1822	0	<0,12	<0,25	<0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, D125A, I414V
V3371	ST123	0	1	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627I/S, M706L	P92S, K143E, N179S, S206A/V, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3372	ST123	0	1	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, K143E, N179S, S206A/V, T231N, I240V, S266P, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, Y598L, S602G, Q668E, S669N, T671DEL, T675A, Q678T, Q685N/H, H688Y

V3374	ST3171	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	V181, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3376	ST123	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, A285V, T418A, S450T, D486N, D511A/E, T551S, S556G, I568T, A627T/S, M706L	R19C, R332K, N356E, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, T507I, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3377	ST123	0	0,25	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, K143E, N179S, S206A/V, T231N, I240V, S266P, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G, Q668E, S669N, T671DEL, T675A, Q678T, Q685N/H, H688Y
V3378	ST16	0	<0,12	<0,25	<0,25		I72T, D136A, K172E, L204P, Y361F, D486N, R628Q/Y, E693K	A124T, I414V
V3379	ST123	0	0,5	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3380	ST3173	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
V3382	ST3177	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, N569K, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, I414V
V3383	ST123	0	<0,12	<0,25	<0,25	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	R19C, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, A364T, I414V, Y432W, G433DEL, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, T625R, K674N
V3384	ST3173	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
V3385	ST123	0	<0,12	<0,25	<0,25	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, K479T, D512E, K513E, T515S, D587E, T625R, K674N
V3386	ST2402	0	0,25	<0,25	0,5	P405T, N455D, K518Q, K521Q, M617I, S671Y, T685A, T688P, A699S/DEL	I72T, L204P, A468S, Y525F, L533V, D541E, V547M, T551S, N595S, R600N, D601T, V603I, S621A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E632Q, E634D, Q636K/T/R, L637M, Q655E/Y, K670N, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, E711K, K720E	P92S, K143E, N179S, S206A/V, T231N, I240V, S266P, Q291E, I300V, E304K, R332K, V408I, I414V, Q415I, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, T521M, A539V, I542V, T547K, A562D/E/P, E568D, E586D, D587E, S589A, V598L, S602G, Q668E, S669N, T671DEL, T675A, Q678T, Q685N/H, H688Y
V3387	ST123	0	0,25	<0,25	<0,25	T606P, T685A, A699S/DEL, G723D	V181, I72T, E146K, N182D, L204P, H212Y, N279T, N284T, R288K, V295I, Q321A, L324M, L325I, V346L, N364S, V367T, L378V, A380E, Y382Q, S383E, Y389F, M401V, Q405E, Q407E, F422Y, A434E, M437L, S445T, S450T, A460V, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, N569K, N595S, R600N, D601T, N616S, L619I, S621A, A625S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, E634D, Q636K/T/R, Q655E/Y, N664K, V673L, K678A/L/N, I680A, A681P, F692L, I701L/V, I708L, F709I/L, K720E	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3388	ST3173	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, A468S, R628Q/Y, A666S/T, K678A/L/N	R19C, A364T, I414V
V3391	ST123	0	0,25	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3393	ST123	0	1	<0,25	0,5	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N

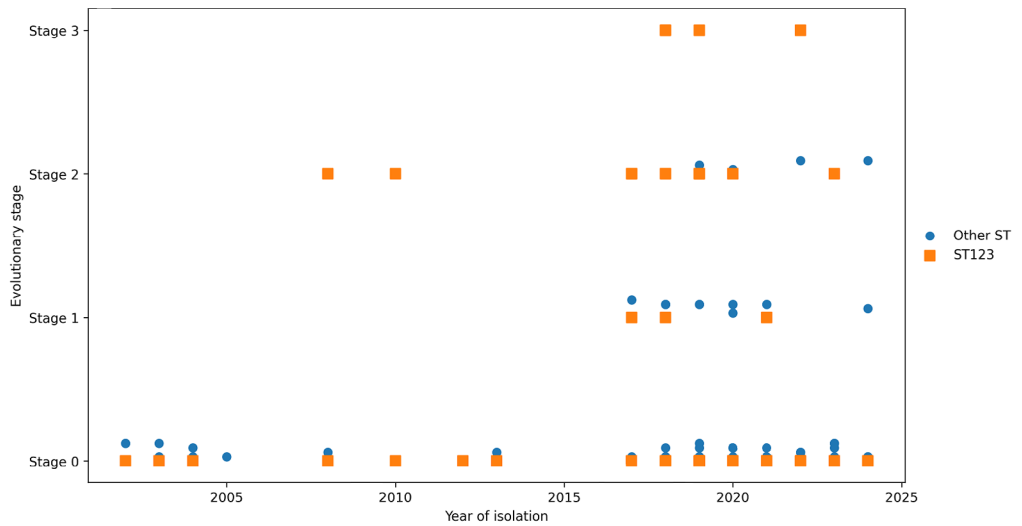
V3396	ST123	0	1	<0,25	0,5	G403D, T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	R19C, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, A364T, I414V, Y432W, G433DEL, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, T625R, K674N
V3398	ST123	0	0,5	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3399	ST3180	0	<0,12	<0,25	<0,25	R118H	R69Q, I72T, L204P, A468S, R628Q/Y	K143E, I414V
V3400	ST3181	0	<0,12	<0,25	<0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N
V3450	ST805	1	0,25	<=0,25	1	M617I, T685A, A699S/DEL	I72T, H130Y, E146K, N182D, P190S, L204P, H212Y, T418A, S450T, T467S, D486N, T491S, V494I/L, D511A/E, R514G/K, Y525F, D541E, V547M, T551S, Q560L, I568T, N595S, R600N, D601T, A627T/S	I414V, T507I, D512E, K513E, T515S, A562D/E/P, E568D, D587E, T625R, D652E, Q655K, Q668E, S669N, K674N, Q685N/H, H688Y, N691DEL/Y
V3486	ST3182	0	<=0,12	<=0,25	<=0,25	T685A, A699S/DEL, G723D	I72T, D136A, L204P, S450T, T551S, I568T, V593S, L597M, S604N, N616S, P622A, A627T/S, R628Q/Y, A630E/G/T, N631K/T, Q636K/T/R, A644S, Q655E/Y, A666S/T, K670N, K678A/L/N, I680A, V685I, E694D/T, I701L/V	P92S, D115N, K143E, N179S, S206A/V, I300V, R332K, N356E, S374A, S375G, T376S/E, I414V, Y432W, G433DEL, K479T, D512E, K513E, T515S, N606I, T625R, K674N

**Figura 1.** Albero filogenetico annotato utilizzando iTOL (<https://itol.embl.de/>). L'albero contiene i 166 genomi di *S. suis* analizzati nel presente studio. Il paese di origine, l'anno di isolamento, sequence type (ST), i valori di MIC per penicillina, ceftiofur e ampicillina e la presenza dei geni di antibiotico resistenza di ciascun isolato sono rappresentati nell'albero filogenetico.

**Figure 1.** Phylogenetic tree annotated using iTOL (<https://itol.embl.de/>). The tree includes the 166 *S. suis* genomes analyzed in the present study. The country of origin, the year of isolation, the sequence type (ST), as well as the MIC values for penicillin, ceftiofur and ampicillin, and the presence of antibiotic resistance genes for each isolate are represented in the phylogenetic tree.



**Figura 2.** Timeline dell'evoluzione clonale verso una ridotta sensibilità ai beta-lattamici.  
**Figure 2.** Timeline of clonal evolution toward beta-lactam reduced susceptibility.



# PUNTEGGIATURA DELLE LESIONI POLMONARI AL MACELLO: METODI A CONFRONTO E CONCORDANZA FRA OSSERVATORI

## ***SCORING PNEUMONIA IN SLAUGHTERED PIGS: COMPARISON AMONG DIFFERENT METHODS AND INTER-RATERS AGREEMENT***

ROMANO A.<sup>1</sup>, BAGHINI A.<sup>1</sup>, D'ALTERIO R.<sup>2</sup>, DI BENEDETTO F.<sup>1</sup>, BATTISTI V.<sup>1</sup>,  
ROSAMILIA A.<sup>2</sup>, CAPOBIANCO DONDONA A.<sup>2</sup>, CIABATTONI U.<sup>3</sup>, PICCIONI M.A.<sup>3</sup>,  
OLIVASTRI A.<sup>3</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Teramo;*

<sup>2</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia-Romagna, sezione di Bologna;*

<sup>3</sup>*Farm4trade s.r.l., Atessa, Chieti;*

<sup>4</sup>*AST Ascoli Piceno Marche – Dipartimento di Prevenzione - Servizio Igiene degli Alimenti di Origine Animale.*

**Parole chiave:** polmonite, suini al macello, metodi di punteggiatura

**Key words:** *pneumonia, slaughtered pigs, scoring methods*

### **Riassunto**

Il macello è un utile *check-point* per stimare l'impatto delle patologie a decorso cronico, quali la polmonite enzootica. Il metodo di *score* più comune per la polmonite è la griglia *Madec*. Tuttavia, negli ultimi anni si tende a privilegiare un approccio basato esclusivamente sull'ispezione visiva dei visceri.

Lo studio mette a confronto la punteggiatura delle lesioni su immagini digitali rispetto al *gold standard* di riferimento (griglia *Madec* supportata dalle indagini istopatologiche). In totale, 690 polmoni sono stati fotografati in posizione usuale e distesi su un piano d'appoggio. Le immagini sono state valutate da 4 osservatori e da una rete neurale artificiale. Inoltre, gli osservatori hanno quantificato la presenza di artefatti.

La valutazione delle immagini da parte degli osservatori mostra valori di concordanza e specificità elevati rispetto al *gold standard*. Piuttosto forte anche la correlazione fra gli *score* assegnati al macello e quelli stimati sulle immagini. L'ispezione dei polmoni su un piano d'appoggio non influisce sulle prestazioni degli osservatori. La rete neurale artificiale raggiunge valori di concordanza moderati/buoni verso il *gold standard* e verso gli osservatori, è specifica e mostra livelli di sensibilità elevati in presenza di lesioni estese. Gli artefatti sono prevalentemente monolaterali e coinvolgono più spesso il polmone sinistro; ciò spiega le migliori *performance* della rete neurale artificiale nell'analisi del polmone destro.

### **Summary**

*The slaughterhouse is a valuable checkpoint for assessing the impact of chronic diseases such as enzootic pneumonia. The most widely used scoring system is the Madec grid. However, in recent years there has been a growing interest for visual-only methods.*

*This study compares lesion scoring performed on digital images with the reference gold standard (i.e., Madec grid supported by histopathological examination). A total of 690 lungs were photographed both in the standard hanging position and laid out on a flat surface. The images were evaluated by four observers and by an artificial neural network. In addition, the observers recorded the presence of artefacts.*

*Observer-based image evaluation showed high agreement and specificity compared with the gold standard. A strong correlation was also observed between the scores assigned at slaughter and those estimated from the images. Examining lungs laid out on a flat surface did not affect observer performance. The artificial neural network showed moderate-to-good agreement with both the gold standard and the observers; it was highly specific and achieved high sensitivity when large lesions were present. Artefacts were predominantly unilateral and more frequently involved the left lung, which explains the better performance of the artificial neural network in the analysis of the right lung.*

## **INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni si è osservato un crescente interesse verso il macello quale utile *check-point* per il monitoraggio dello stato sanitario e del benessere del suino, in condizioni relativamente standardizzate e controllate. Il macello consente di valutare un elevato numero di animali in un breve arco temporale, attraverso procedure piuttosto uniformi e ripetibili, con un rapporto costi/benefici solitamente favorevole rispetto alle visite aziendali. Inoltre, le osservazioni al macello riducono la frequenza degli accessi in allevamento, contribuendo così a elevare gli *standard* di biosicurezza (Carroll *et al.*, 2016; Grandin, 2017).

Il macello è particolarmente utile per stimare la prevalenza e l'impatto economico delle patologie a decorso cronico, compatibili con la sopravvivenza dell'animale e ancora visibili a distanza di settimane/mesi dall'insorgenza. Per questo motivo, è diventata una pratica comune la punteggiatura delle lesioni riferibili a polmonite enzootica (PE), che risponde ai criteri sopra descritti. In Europa, il metodo di *score* più comune delle lesioni *PE-like* è la cosiddetta "griglia *Madec*", che prevede l'ispezione visiva e la palpazione del parenchima polmonare (Madec e Kobisch, 1982). Tuttavia, negli ultimi anni si tende a privilegiare un approccio basato esclusivamente sull'ispezione visiva dei visceri (metodi "*visual-only*"), per ragioni sia logistiche che normative (Regolamento EU 2019/627). Inoltre, i metodi "*visual-only*" sono funzionali allo sviluppo di tecnologie di *computer vision*, basate sull'intelligenza artificiale e potenzialmente in grado di automatizzare il processo (Bonicelli *et al.*, 2021; Hattab *et al.*, 2023).

Lo studio si pone l'obiettivo di mettere a confronto la punteggiatura delle lesioni su immagini digitali rispetto al *gold standard* di riferimento (vale a dire, l'applicazione della griglia *Madec* successivamente supportata dalle indagini istopatologiche), valutando la concordanza fra diversi osservatori e le *performance* di una rete neurale convoluzionale (*Convolutional Neural Network*, CNN) precedentemente addestrata.

## **MATERIALI E METODI**

### **Il gold standard di riferimento**

In totale, sono stati inclusi nello studio 345 suini pesanti italiani, regolarmente macellati ed esaminati nel corso di 5 giornate di macellazione. Un veterinario esperto ha effettuato lo *score* al macello mediante ispezione e palpazione, seguendo la griglia *Madec*. Ogni lesione o sospetta tale è stata campionata, fissata in formalina neutra tamponata al 10% e processata come di *routine* per gli approfondimenti istopatologici del caso (colorazione in ematossilina-eosina). Sono stati considerati patologici esclusivamente i polmoni con lesioni rilevate macroscopicamente al macello e confermate istologicamente (*gold standard*).

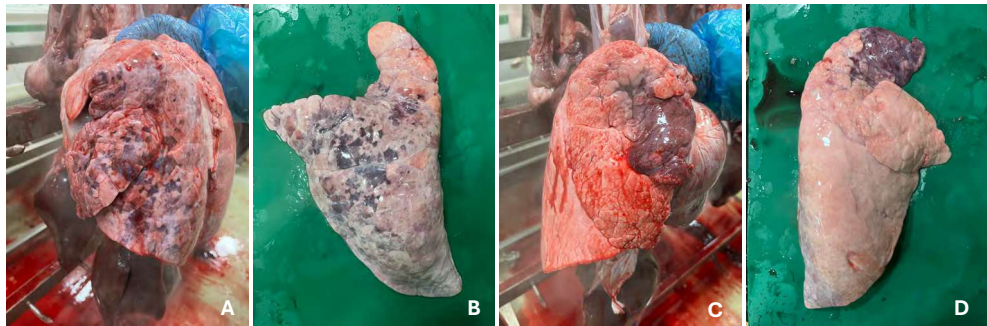
### **Punteggiatura visiva dei polmoni su immagini digitali**

Tutti i 690 polmoni oggetto di studio sono stati fotografati al macello, utilizzando la fotocamera ad alta risoluzione di uno *smartphone* (i-Phone 13). In particolare, ogni polmone è stato fotografato nella sua posizione più usuale (vale a dire con l'apparato respiratorio appeso a un gancio a livello della trachea), nonché isolato e disteso su un piano d'appoggio (vedi Fig. 1). Tutte le immagini acquisite sono state identificate con numerazione progressiva

e valutate da 4 osservatori, ivi compreso chi ha effettuato lo *score* al macello. Ciascun osservatore ha espresso un giudizio unico su ciascuna immagine (“sano” vs. “patologico”) e ha assegnato un punteggio seguendo, anche in questo caso, i dettami della griglia *Madec*. Inoltre, gli osservatori hanno segnalato e quantificato la presenza di artefatti da macellazione: 0 = artefatti assenti o considerati ininfluenti ai fini della punteggiatura; 1 = presenza di lievi artefatti; 2 = artefatti molto evidenti, che compromettono sostanzialmente l’interpretazione dell’immagine.

### **Punteggiatura automatica dei polmoni**

L’intero *set* di immagini è stato somministrato ad una CNN precedentemente addestrata (Bonicelli *et al.*, 2021; Hattab *et al.*, 2023). I giudizi sono stati espressi anche in questo caso in modo binario (“sano” vs. “patologico”) e quantitativo (rapporto fra parenchima patologico e superficie totale del polmone stesso, espresso in %).



**Figura 1. Polmoni di un suino fotografati al macello:** (A) polmone sinistro con i visceri appesi al gancio; (B) polmone sinistro isolato e poggiato su un piano; (C) polmone destro con i visceri appesi al gancio; (D) polmone destro isolato e poggiato su un piano. Nelle immagini C e D è ben visibile una lesione PE-like piuttosto estesa.

**Figure 1. Pictures of porcine lungs taken at the slaughterhouse:** A) left lung with the viscera hanging from the hook; B) isolated left lung placed on a flat surface; C) right lung with the viscera hanging from the hook; D) isolated right lung placed on a flat surface. An enzootic pneumonia-like lesions is evident in pictures C and D.

### **Analisi statistica**

Tutti i dati raccolti sono stati riportati in un foglio di Microsoft®Excel. Le prestazioni di ciascun osservatore e della CNN sono state confrontate reciprocamente e con il *gold standard* di riferimento in termini di concordanza, sensibilità e specificità.

### **RISULTATI**

In totale, 110 polmoni (16% dell’intero campione esaminato) sono stati riconosciuti patologici al macello e confermati all’esame istopatologico. In 52 casi le lesioni erano a carico del polmone sinistro, in 58 casi interessavano il polmone destro, mentre in 31 suini le lesioni erano bilaterali.

In Tabella 1 sono riportati i valori di concordanza, sensibilità e specificità dei vari osservatori e della CNN rispetto al *gold standard*, considerando esclusivamente la presenza/assenza di lesioni. Da notare che la CNN ha esaminato soltanto i polmoni in posizione *standard* (vale a dire, visceri appesi al gancio a livello tracheale), poiché mai addestrata con immagini differenti (vale a dire, polmoni disposti singolarmente su un piano d’appoggio). La concordanza complessiva fra i 4 osservatori (sano vs. patologico) è stata pari a 0.90 (Gwet’s AC1).

**Tabella 1.** Valutazioni degli osservatori e della CNN messe a confronto con il *gold standard* di riferimento

Osservatori	Polmoni appesi al gancio					Polmoni su piano d'appoggio			
	A*	B	C	D	CNN	A*	B	C	D
Concordanza**	0.83	0.84	0.80	0.80	0.60	0.83	0.84	0.81	0.78
Sensibilità	0.65	0.85	0.71	0.67	0.62	0.74	0.81	0.79	0.68
Specificità	0.96	0.93	0.94	0.94	0.84	0.95	0.94	0.93	0.92

\*L'osservatore A è lo stesso che ha applicato la griglia *Madec* al macello. \*\*Considerando lo sbilanciamento del *set* di immagini (i polmoni sani erano molto più numerosi), la concordanza è stata stimata in termini di *Prevalence-Adjusted Bias-Adjusted K* (PABAK).

\*Observer A applied the *Madec* scoring grid at the slaughterhouse; \*\*Because of the imbalance of the image dataset (healthy lungs are far more numerous), agreement was estimated using the *Prevalence-Adjusted Bias-Adjusted Kappa* (PABAK).

Le prestazioni della CNN rispetto al *gold standard* sono risultate inferiori rispetto agli osservatori, soprattutto in termini di concordanza e sensibilità; le prestazioni della CNN migliorano notevolmente nel caso delle lesioni più estese (*score Madec* <sup>33</sup>), raggiungendo valori di sensibilità pari al 90%. Inoltre, la CNN raggiunge *performance* più elevate nell'analisi del polmone destro rispetto al sinistro (Tabella 2).

**Tabella 2.** *Performance* della CNN rispetto al *gold standard* di riferimento, distinte fra polmone destro e sinistro

	Polmone destro	Polmone sinistro
Concordanza (PABAK)	0.69*	0.51*
Sensibilità	0.62	0.61
Specificità	0.89*	0.78*

\*Differenze statisticamente significative ( $p < 0.01$ ). Le differenze sono da attribuire soprattutto al numero di falsi positivi, doppio nel caso del polmone sinistro rispetto al destro.

Il confronto della CNN con i giudizi espressi dagli osservatori sulle immagini digitali evidenzia livelli di sensibilità piuttosto bassi (Tabella 3); anche in questo caso, la sensibilità aumenta notevolmente (>90%) nel caso delle lesioni più estese (*score Madec* <sup>33</sup>).

**Tabella 3.** *Performance* della CNN rispetto all'esame delle immagini digitali

<b>Performance complessive della CNN rispetto agli osservatori</b>				
	A	B	C	D
Sensibilità	0.42	0.35	0.50	0.43
Specificità	0.95	0.96	0.94	0.93
Concordanza	0.65	0.62	0.66	0.62
<b>Performance della CNN rispetto agli osservatori sulle lesioni più gravi (<i>score Madec</i> <math>\geq 3</math>).</b>				
	A	B	C	D
Sensibilità	0.96	0.93	0.93	0.93

Per quanto riguarda i punteggi assegnati dagli osservatori sulle immagini digitali, la correlazione complessiva è risultata forte e statisticamente significativa rispetto al *gold standard* (*Spearman rank correlation* medio = 0.78 con  $p < 0.001$ ); la correlazione fra gli *score* assegnati al macello e quelli espressi da ciascun osservatore sulle immagini digitali è risultata variabile fra 0.65 e 0.72. Infine, la correlazione fra i punteggi assegnati dalla CNN e il *gold standard* è risultata positiva, piuttosto debole ( $\rho$  (rho) = 0.364) e statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ).

Il numero di polmoni di difficile interpretazione a causa degli artefatti variava fra 36 e 103, testimoniando la diversa sensibilità degli osservatori. In ogni caso, gli artefatti più marcati coinvolgevano quasi esclusivamente i polmoni sinistri (percentuale variabile fra il 90% e il 100%).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel complesso, la valutazione delle immagini digitali da parte di osservatori “allenati” pare essere uno strumento valido per identificare la presenza di lesioni PE-like, con valori di concordanza e specificità estremamente elevati rispetto al *gold standard*. Il parametro più “critico” è rappresentato dalla sensibilità. Sono in corso di valutazione le principali cause di “falsi negativi”, probabilmente determinati dalla presenza di lesioni molto piccole e/o nascoste dalla sovrapposizione dei lobi. Al riguardo, Ghidini *et al.* (2023) affermano che i metodi “visual-only” sono meno accurati nel riconoscere i polmoni sani e/o le lesioni di piccole dimensioni. A nostro avviso, le *performance* degli osservatori appaiono fin troppo buone rispetto alle attese, probabilmente in ragione dall’abitudine a valutare immagini di questo tipo. Inoltre, non sembrano influenzate dalla precedente punteggiatura degli stessi polmoni al macello (le prestazioni dell’osservatore A – unico ad aver applicato la griglia *Madec* al macello – sono sovrapponibili a quelle degli altri osservatori). Piuttosto forte anche la correlazione fra gli *score* assegnati al macello e quelli stimati sulle immagini digitali, sebbene per queste ultime la griglia *Madec* non sia considerata il metodo di elezione (Garcia-Morante *et al.*, 2016).

L’ispezione dei polmoni su un piano d’appoggio non è realistica in condizioni di campo. Tuttavia, abbiamo ritenuto utile valutare anche questa tipologia di immagini, poiché impiegata da Valeris-Chacin *et al.* (2025) allo scopo di addestrare reti neurali artificiali. L’impressione – difficile da sostenere con dati scientificamente solidi – è che la loro analisi sia più semplice e rapida, ma non aggiunga molte informazioni né influisca positivamente sulla sensibilità e specificità degli osservatori.

Le *performance* offerte dalla CNN sono, a nostro avviso, interessanti e in linea con risultati ottenuti precedentemente in diverse condizioni (Hattab *et al.*, 2023; Romano *et al.*, 2025). Di fatto, la CNN mostra una concordanza moderata/buona verso il *gold standard* e verso gli osservatori abituati a svolgere questo tipo di attività. Ovviamente, le prestazioni possono essere migliorate, utilizzando reti di nuova generazione (la CNN usata in questo studio è già piuttosto datata), implementando il suo addestramento e la qualità delle immagini (vedi oltre). Tuttavia, i risultati indicano che la CNN è piuttosto specifica e raggiunge livelli di sensibilità elevati in presenza di lesioni di rilievo, così rispondendo alle esigenze dei potenziali utilizzatori. La correlazione fra i punteggi espressi dalla CNN e gli *score* assegnati dall’operatore secondo la griglia *Madec* è bassa, anche se positiva e statisticamente significativa; ciò è pienamente in linea con le nostre esperienze precedenti e non sorprende, poiché si tratta di sistemi di misurazione concettualmente distanti (Romano *et al.*, 2025).

La presenza di artefatti (es. *inspiratio sanguinis*, ribaltamento e/o sovrapposizione dei lobi), facili da discriminare alla palpazione, complica non poco l’interpretazione delle immagini. È tuttora in corso di analisi il loro reale impatto, in termini di falsi positivi e falsi negativi,

soprattutto per la CNN. Di certo, gli artefatti più intensi sono monolaterali e coinvolgono quasi sempre il polmone sinistro (vale a dire quello più declive durante la iugulazione). Questo aspetto spiega le migliori *performance* della CNN nell'analisi del polmone destro e merita ulteriore attenzione, soprattutto ai fini dell'automazione del processo. L'esame di un numero maggiore di polmoni chiarirà quanto potrebbe incidere l'esame del solo polmone destro sullo *score* complessivo di una partita. A tal proposito, è utile ricordare che altri autori hanno già cercato di risolvere questo problema, proponendo dei fattori di conversione nel caso in cui uno dei polmoni non sia disponibile (Straw *et al.*, 1999).

## BIBLIOGRAFIA

1. Bonicelli L., Trachtman A.R., Rosamilia A., Liuzzo G., Hattab J., Mira Alcaraz E., Del Negro E., Vincenzi S., Capobianco Dondona A., Calderara S., Marruchella G. (2021) "Training convolutional neural networks to score pneumonia in slaughtered pigs". *Animals* 11(11):3290.
2. Carroll G.A., Boyle L.A., Teixeira D.L., van Staaveren N., Hanlon A., O'Connell N. E. (2016) "Effects of scalding and dehairing of pig carcasses at abattoirs on the visibility of welfare-related lesions". *Animal* 10(3):460–467.
3. Garcia-Morante B., Segales J., Fraile L., Perez de Rozas A., Maiti H., Coll T., Sibila M. (2016) "Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced pneumonia using different lung lesion scoring systems: a comparative review". *J Comp Pathol.* 154(2-3):125-34.
4. Ghidini S., De Luca S., Rinaldi E., Zanardi E., Ianieri A., Guadagno F., Alborali G.L., Meemken D., Conter M., Varrà M.O. (2023) "Comparing visual-only and visual-palpation post-mortem lung scoring systems in slaughtering pigs". *Animals* 13(15), 2419.
5. Grandin, T (2017) "On-farm conditions that compromise animal welfare that can be monitored at the slaughter plant". *Meat Sci.* 132:52–58.
6. Hattab J., Porrello A., Romano A., Rosamilia A., Ghidini S., Bernabò N., Capobianco Dondona A., Corradi A., Marruchella G. (2023) "Scoring enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs: traditional vs. artificial-intelligence-based methods". *Pathogens* 12(12):1460.
7. Madec F., Kobisch M. (1982) "Bilan lesionnel des poumons de porcs charcutiers a l'abattoir [Gross lung lesions of pigs at slaughter]". *J Rech Porc Fr.* 14:405-12.
8. Romano A., Marruchella G., Schirotti L., Momeny M., Tiburzi A., D'Agostino D., D'Alterio R., Capobianco Dondona A., Del Negro E. (2025). "Punteggiatura automatica della polmonite del suino: dalla teoria alla pratica". In: "50° Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini, 17-18 aprile 2025", Lazise, 107-115.
9. Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (1999) "Diseases of Swine" 8<sup>th</sup> edition, New Jersey USA, Wiley Blackwell.
10. Valeris-Chacin R., Garcia-Morante B., Sibila M., Canturri A., Ballarà Rodriguez I., Orozco I.B., Casadevall R.J., Muñoz P., Pieters M. (2025) "Scoring of swine lung images: a comparison between a computer vision system and human evaluators". *Vet Res.* 56(1):9.

# **QUALI PRODOTTI DISINFETTANTI SCEGLIERE PER PROTEGGERSI DALLA PESTE SUINA AFRICANA (PSA)?**

## ***WHICH DISINFECTANTS SHOULD YOU CHOOSE AGAINST AFRICAN SWINE FEVER (ASF)?***

BEATO, M.S., PAVONE S., MONTAGNIN C., ISCARO, C., FELIZIANI F.

*Centro Di Referenza Nazionale Per Le Pesti Suine (CEREP)  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche "Togo Rosati",  
Via G. Salvemini 1, 06126 Perugia, Italy*

**Parole chiave:** Peste Suina Africana, disinfettanti

**Key Words:** African Swine Fever, disinfectants

### **Riassunto**

La Peste Suina Africana (PSA), malattia virale dei suidi, rappresenta ad oggi la maggiore minaccia per il patrimonio suinicolo mondiale. Non essendo disponibili strumenti di prevenzione come i vaccini, la adozione di rigorose misure di biosicurezza e il loro mantenimento nel tempo, soprattutto nelle zone infette, sono indispensabili per prevenire l'ingresso e la diffusione del virus in allevamento. Tra queste misure, le operazioni di pulizia e disinfezione rientrano nei sistemi di prevenzione e di gestione di un focolaio di PSA. La scelta consapevole e l'uso adeguato di disinfettanti in grado di decontaminare ambiente, strumenti ed attrezzature dal virus rappresenta un concreto strumento di controllo della malattia.

### **Abstract**

African swine fever (ASF), a viral disease affecting pigs, currently represents the greatest threat to the global pig population. As there are no preventive measures such as vaccines available, the adoption of strict biosecurity measures and their maintenance over time, especially in the affected areas, are essential to prevent the virus from entering and spreading in pig farms. Among these measures, cleaning and disinfection operations are part of the prevention and management systems for an ASF outbreak. The informed choice and proper use of disinfectants capable of decontaminating the environment, tools and equipment from the virus is a concrete tool for controlling the disease.

### **INTRODUZIONE**

Il virus della peste suina africana (PSA) (*Asfvirus haemorrhagiae*) è un agente patogeno unico nel suo genere. Si tratta di un virus a DNA di grandi dimensioni, tra i più grandi virus patogeni che colpiscono gli animali; è tenace e resistente in diverse condizioni ambientali oltreché stabile dal punto di vista genetico. Queste caratteristiche lo rendono insidioso ed in grado di provocare una malattia che risulta non particolarmente contagiosa ma estremamente letale, che persiste nell'ambiente esterno spesso indisturbata e che, alla minima distrazione, supera le barriere degli allevamenti suinicoli. In realtà, il virus della PSA non agisce da solo, ma sfrutta un altro complice, per lo più inconsapevole, per portare a compimento il suo progetto di infezione: l'uomo, ritenuto il principale responsabile dell'ingresso del virus negli allevamenti, così come nelle popolazioni selvatiche, attraverso innumerevoli attività che trasportano letteralmente il virus in giro per il mondo. Per questo motivo, la PSA è considerata una malattia condizionata dall'uomo (human-mediated), il quale pur non essendo

recettivo, è coinvolto nei suoi cicli epidemiologici. La PSA è una malattia che colpisce esclusivamente i suini (domestici e selvatici). Attualmente, è presente in tutti i continenti, inclusa l'Europa. Notificata in diverse regioni dell'Italia continentale sin dal 2022, la PSA risulta presente ad oggi nel cluster del nord-ovest, che coinvolge le regioni Piemonte, Liguria, Lombardia, Emilia-Romagna, Toscana e comprende un'ampia area di infezione in espansione. Presente nelle popolazioni selvatiche di quei territori, la malattia ha coinvolto anche numerosi allevamenti suinicoli, facendo registrare due ondate epidemiche nel corso dei mesi estivi del 2023 e del 2024, concentrati in Lombardia, Piemonte ed Emilia-Romagna. L'irruzione della malattia nel settore domestico ha provocato ripercussioni sanitarie ed economiche ingenti, dall'abbattimento dei capi negli allevamenti sede di focolaio e in quelli vuotati in via preventiva, ai divieti di movimentazione di suini vivi e dei prodotti a base di carne suina, al deprezzamento di questi sui mercati. È stato acclarato che l'ingresso del virus e la sua diffusione negli allevamenti sono spesso avvenuti a causa di falle nei sistemi di biosicurezza degli allevamenti stessi, sia di tipo strutturale che, soprattutto, gestionale. Le corrette procedure di pulizia e disinfezione, in questo senso, appaiono cruciali.

## **MATERIALI E METODI**

I disinfettanti, definiti come presidi medico chirurgici (PMC) in base alla normativa nazionale (1, 2), sono attualmente classificati come biocidi in base al regolamento europeo n. 528/2012 ("Regolamento biocidi", 3). Attualmente diversi prodotti registrati come PMC hanno iniziato o stanno concludendo la fase di registrazione secondo il Regolamento biocidi; pertanto, è possibile ancora trovare sul mercato prodotti PMC in questa fase transitoria. Un biocida è definito come una sostanza o miscela, in grado di distruggere, eliminare, rendere innocuo o esercitare altro effetto di controllo su qualsiasi organismo nocivo. Sul mercato nazionale, ad oggi, è possibile trovare sia PMC autorizzati per il commercio in Italia, sia biocidi autorizzati per il commercio in Europa, inclusa l'Italia (4). I PMC riportano in etichetta il numero di registrazione presso il Ministero della Salute, e questo indica la conclusione dell'iter autorizzativo di un determinato prodotto e la definitiva possibilità di essere commercializzato sul mercato nazionale. Anche i biocidi, prima di poter essere immessi sul mercato europeo, devono ottenere un'autorizzazione, che può essere di diversa tipologia, in base al prodotto e al numero di paesi in cui si intende commercializzarlo. Sia i PMC che i biocidi, inoltre, riportano in etichetta lo spettro d'azione (es. battericida, fungicida, virucida) e il tipo di prodotto (Product type, PT) che definisce la destinazione d'uso e il contesto applicativo. I disinfettanti destinati all'uso veterinario, inclusi quelli impiegati per materiali e superfici associati al ricovero o al trasporto di animali e utilizzati in ambiente zootecnico in presenza/circolazione di malattie infettive ad eziologia virale, appartengono alla tipologia PT3 (igiene veterinaria) o PT4 (Disinfettanti nel settore dell'alimentazione umana e animale).

## **RISULTATI**

La scelta del disinfettante da impiegarsi in allevamento deve essere fatta in funzione delle caratteristiche del prodotto, che possono essere chiaramente reperite sulla confezione del prodotto stesso. In particolare, per i PMC, l'uso specifico come disinfettante è indicato sull'autorizzazione e sulla etichetta del prodotto. Per i biocidi invece, le caratteristiche utili da conoscere (il PT, l'uso, gli organismi bersaglio, il campo ed il metodo di applicazione, le dosi d'impiego, le istruzioni specifiche d'uso, le precauzioni obbligatorie per garantire la sicurezza dell'operatore e l'efficacia del prodotto) sono indicate nel sommario delle caratteristiche del prodotto (SPC). Questo vuol dire che, prima di acquistare un prodotto da impiegarsi contro il virus della PSA, è necessario verificare i contenuti d'uso ed autorizzativi presenti sul prodotto stesso; è necessario controllare l'uso come disinfettante virucida e

l'appartenenza alla categoria PT3. La presenza del numero di registrazione che deve essere riportato sull'etichetta del prodotto è la garanzia che il prodotto è regolarmente registrato per l'uso per il quale è venduto. Se il prodotto è registrato come biocida ai sensi del Regolamento biocidi, esso deve riportare un numero di registrazione. Tale numero varia in funzione della tipologia di autorizzazione: sarà preceduto dalle lettere IT se l'autorizzazione è nazionale (IT/20XX/XXXX) oppure preceduto dalle lettere EU (EU-XXXX) se l'autorizzazione è Europea. Tra gli ulteriori fattori generali da considerare nella scelta di un disinfettante, rientrano la compatibilità con diversi materiali, le condizioni di sicurezza per gli operatori che lo devono impiegare, la sostenibilità ambientale, nonché il rapporto costo-efficacia a parità di condizioni di impiego. Sono meno rilevanti, per la valutazione del prodotto, le altre informazioni eventualmente riportate sulla confezione, che hanno un valore esclusivamente commerciale e/o pubblicitario. L'efficacia della procedura di disinfezione non dipende soltanto dalla corretta scelta del disinfettante, ma anche dal suo uso appropriato. La quantità di prodotto da impiegarsi in base all'estensione dell'area da trattare, la corretta diluizione d'uso e i tempi di contatto del disinfettante sul materiale da trattare, sono informazioni dichiarate dal produttore e facilmente verificabili. Esse dovrebbero essere rispettate scrupolosamente, per impiegare quel prodotto nelle migliori condizioni di efficacia documentata. Da non sottovalutare l'importanza delle operazioni preliminari di pulizia che, se non eseguite in maniera appropriata, riducono notevolmente l'efficacia delle successive operazioni di disinfezione. La rimozione almeno dello sporco grossolano, infatti, permette al disinfettante di agire direttamente sulla superficie da decontaminare. Dopo la pulizia è necessario attendere che la superficie sia asciutta, per evitare che il disinfettante che si andrà ad utilizzare venga diluito, riducendone l'efficacia. Infine, è buona pratica riportare nel manuale di biosicurezza dell'allevamento la procedura di pulizia e disinfezione da applicare in caso di focolaio. Il protocollo deve specificare i prodotti da impiegare, le modalità operative, la concentrazione, i tempi di contatto e la sequenza delle fasi, così da garantire un'applicazione coerente, riproducibile e verificabile.

## **DISCUSSIONE**

Il virus della PSA si trasmette per contatto diretto attraverso animali infetti ma, soprattutto, per contatto indiretto attraverso vettori meccanici, per esempio indumenti, calzature, attrezzi e mezzi agricoli. Poiché il virus è estremamente resistente nell'ambiente, qualsiasi materiale contaminato può diventare un veicolo per la sua diffusione. Per questo motivo, l'applicazione costante e rigorosa delle misure di biosicurezza è fondamentale: in loro assenza, il virus può entrare in allevamento facilmente attraverso vie diverse. Quando viene confermata la positività alla PSA in un allevamento, questo deve essere considerato un ambiente con un elevato livello di contaminazione virale. Il rischio è duplice: da un lato, lo stabilimento contaminato rappresenta un pericolo in termini di ulteriore diffusione del virus verso altri allevamenti, mediante trasporto meccanico; dall'altro, lo stabilimento può rimanere contaminato a lungo, se non si applicano le opportune modalità di pulizia e disinfezione. Queste ultime, inoltre, risultano necessarie non solo nella fase di gestione del focolaio, quando si applicano le misure previste dalla normativa in seguito alla conferma di malattia (divieto di movimentazione di animali e prodotti, abbattimento dei capi e successivo smaltimento, gestione del materiale di azienda incluso letame/liquami, operazioni di pulizia e disinfezione, etc.), ma anche successivamente, quando cioè l'allevamento è stato depopolato. Infatti, se l'assoluta sterilizzazione di un'azienda zootecnica non è un obiettivo raggiungibile, è comunque imprescindibile adoperarsi per ridurre al minimo il rischio che la contaminazione virale continui a persistere nell'ambiente. Il disinfettante rappresenta uno degli strumenti a disposizione degli allevatori contro la PSA. Ma, in realtà, non è necessario scegliere un

disinfettante che riporti esplicitamente una efficace azione nei confronti del virus della PSA. Piuttosto, va scelto un prodotto disinfettante che abbia azione virucida, efficace nei confronti dei patogeni virali in generale, incluso il virus della PSA. La scelta, inoltre, dovrebbe tenere conto di altre variabili: le caratteristiche dell'allevamento e delle superfici da trattare, le modalità operative, gli aspetti di sicurezza e di sostenibilità ambientale.

## **CONCLUSIONI**

Le pratiche di pulizia e disinfezione dovrebbero rappresentare, per ogni operatore, una abitudine consolidata adottata in tempo di pace e non solo in situazioni di emergenza, in grado di mantenere costantemente adeguate le condizioni igieniche di stalla e per costruire una barriera preventiva pronta a reggere quando si presenta l'emergenza PSA. Quando la malattia entra in allevamento, infatti, la gestione del focolaio richiede una maggiore attenzione in termini di biosicurezza. Essere "biosicuro", quindi, fa vincere due volte: la prima, perché riduce fortemente il rischio che un patogeno possa entrare in allevamento; la seconda, perché impedisce che un patogeno possa diffondersi da un allevamento infetto ad altri. Nel caso della PSA, infatti, è sufficiente che un solo allevamento suinicolo risulti colpito dalla malattia per causare una cascata di eventi che si ripercuotono sull'intero territorio infetto, coinvolgendo anche tutti gli altri allevamenti suinicoli che vi ricadono. Questo è il motivo per il quale sarebbe auspicabile fare rete: se gli operatori suinicoli, anche attraverso le proprie associazioni di categoria, potessero beneficiare di formazione specifica ed indicazioni operative, l'intero territorio ne gioverebbe, perché diminuirebbe la probabilità che il virus possa fare breccia in allevamento. Anche il sistema veterinario, rappresentato dai veterinari ufficiali e da quelli liberi-professionisti/aziendali, è attivamente coinvolto, rappresentando il punto di riferimento per mettere in piedi un sistema di biosicurezza efficace in allevamento. Adottare pratiche quotidiane di biosicurezza e mantenere nel tempo un elevato livello di attenzione verso questi aspetti richiede risorse rilevanti, ma fa la differenza nel controllo della PSA negli allevamenti.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA 6 ottobre 1998, n. 392. Regolamento recante norme per la semplificazione dei procedimenti di autorizzazione alla produzione ed all'immissione in commercio di presidi medicochirurgici, a norma dell'articolo 20, comma 8, della legge 15 marzo 1997, n. 59. (GU Serie Generale n.266 del 13-11-1998). <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1998/11/13/098G0442/sg>
2. MINISTERO DELLA SANITA', PROVVEDIMENTO 5 febbraio 1999. Approvazione dei requisiti della domanda e relativa documentazione da presentare ai fini dell'autorizzazione all'immissione in commercio ed alla variazione di autorizzazioni già concesse per i presidi medicochirurgici. (GU Serie Generale n.34 del 11-02-1999). <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1999/02/11/099A0995/sg>
3. REGOLAMENTO (UE) n. 528/2012 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 maggio 2012 relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0528&qid=1772182377060>
4. Manuale Operativo delle Pesti Suine nei suidi detenuti, ultima revisione. [https://www.izsum.it/area\\_letturaActPro/160/pagsistema.html](https://www.izsum.it/area_letturaActPro/160/pagsistema.html)

# EFFETTI DI UN INTEGRATORE NUTRIZIONALE ARRICCHITO DI FERRO SULLA CRESCITA DEI SUINETTI E SULLE PRESTAZIONI NELLO SVEZZAMENTO

## *EFFECTS OF AN IRON-ENRICHED NUTRITIONAL SUPPLEMENT ON PIGLET GROWTH AND WEANING PERFORMANCE*

NUÑEZ ZENA C.<sup>1</sup>, VAN DEN BORNE J.<sup>1,2</sup>, DO CARMO SILVA L.<sup>3</sup>, SMOLDERS M.<sup>1</sup>,  
LONGO A.<sup>3</sup>, COPPENS H.<sup>1</sup>, MARTINS M.<sup>3</sup>, PEREIRA BRAGA S.<sup>3</sup>, BECCALOSSO M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Schippers Europe BV, The Netherlands;*

<sup>2</sup>*HAS University of Applied Sciences, The Netherlands;*

<sup>3</sup>*Cooperativas Orensanas Sociedad Cooperativa COREN, Spain*

**Parole chiave:** Svezzamento, Ferro, Integrazione

**Key words:** Weaning, Iron, Integration

### **Riassunto**

I suini ingeriscono naturalmente terreno come fonte di ferro e fibre: tale comportamento ha portato allo sviluppo di un integratore a base di torba naturale arricchita di ferro (MS TerraFeed Fe) progettato per supportare lo sviluppo fisiologico dei suinetti lattanti. Questo studio ha valutato gli effetti della supplementazione con MS TerraFeed Fe sulle prestazioni di crescita pre- e post-svezzamento in un allevamento commerciale nel nord-ovest della Spagna. Due gruppi (controllo e trattamento), ciascuno composto da 12 nidiature, hanno ricevuto la stessa gestione nutrizionale e sanitaria, mentre il gruppo trattamento ha ricevuto MS TerraFeed Fe dal giorno 3 al giorno 21 (150–300 g/suinetto). Il peso corporeo e la mortalità sono stati monitorati fino a 70 giorni di età. La mortalità e l'uso di farmaci sono risultati simili tra i gruppi. Tuttavia, il gruppo trattamento ha mostrato peso corporeo e incremento medio giornaliero significativamente superiori sia allo svezzamento che a 70 giorni di vita ( $P < 0,05$ ). La supplementazione con MS TerraFeed Fe migliora quindi le prestazioni di crescita dei suinetti lattanti in condizioni di campo.

### **Abstract**

Pigs naturally ingest soil as a source of iron and fiber, a behavior that led to the development of an iron-enriched natural peat-based supplement (MS TerraFeed Fe) designed to support the physiological development of suckling piglets. This study evaluated the effects of MS TerraFeed Fe supplementation on pre- and post-weaning growth performance on a commercial farm in northwestern Spain. Two groups (control and treatment), each consisting of 12 litters, received identical nutritional and health management, while the treatment group received MS TerraFeed Fe from day 3 to day 21 (150–300 g/piglet). Body weight and mortality were monitored up to 70 days of age. Mortality and medication use were similar between groups. However, the treatment group showed significantly higher body weight and average daily gain both at weaning and at 70 days of age ( $P < 0.05$ ). Supplementation with MS TerraFeed Fe therefore improves the growth performance of suckling piglets under field conditions.

## **INTRODUZIONE**

In condizioni naturali, i suini ingeriscono il terreno come fonte di ferro e fibre alimentari (Zimmerman et al., 2019). Sulla base di questo comportamento innato, è stato sviluppato MS TerraFeed Fe, un prodotto a base di torba come integratore nutrizionale funzionale per i suinetti lattanti. Il prodotto fornisce fibre fermentescibili, sostanze umiche e ferro chelato altamente biodisponibile, studiato per supportare lo sviluppo fisiologico precoce. L'inclusione di questi componenti contribuisce alla modulazione dell'ambiente intestinale, migliorando la biodisponibilità dei micronutrienti, riducendo il pH intestinale e supportando l'integrità intestinale e la funzione immunitaria, il che può contribuire a ridurre l'incidenza di diarrea (Trckova et al., 2005). Inoltre, è stato dimostrato che l'integrazione con torba esercita effetti positivi sulla composizione del microbiota intestinale (Trckova et al., 2005; Van Hees et al., 2019; Visscher et al., 2019), migliorando così lo stato di salute generale e le prestazioni di crescita nei suinetti lattanti.

## **MATERIALI E METODI**

La sperimentazione è stata condotta presso l'allevamento Bouzo, situato nel nord-ovest della Spagna. L'allevamento fa parte del Gruppo Coren e ospita 2.100 scrofe Hypor. Sono state utilizzate due sale, ciascuna con 12 box. In entrambe le sale è stata utilizzata la stessa configurazione per l'esecuzione della prova (numero di box e animali coinvolti, oltre alla distribuzione spaziale). Sono stati selezionati due gruppi (Controllo e Trattamento), entrambi composti da 6 nidiatae per sala (totale 12 nidiatae per gruppo) e la prova è iniziata il 3° giorno dopo la nascita dei suinetti. Oltre ai trattamenti, i suinetti hanno ricevuto un mangime sottoscrofa per i primi 4 giorni di svezzamento, seguito da 15 giorni di dieta pre-starter. Durante il restante periodo di svezzamento, i suinetti hanno ricevuto una dieta starter. Inoltre, i suinetti hanno ricevuto 1,5 cc di Forceris (Ceva Salute Animale S.P.A.) a 48 ore di vita. La selezione dei gruppi di trattamento per scrofe e figliate è stata effettuata nel modo più omogeneo possibile in termini di ordine di parto delle scrofe e numero di nidiatae primipare. I suinetti sono stati svezzati all'età di 28 giorni. Le nidiatae sono state assegnate, per gruppo, a box di svezzamento con circa 26 suinetti per box, entrambi i gruppi nella stessa sala. Dopo lo svezzamento, tutti i suinetti hanno ricevuto la stessa dieta, composta da mangime pre-starter e mangime starter.

Trattamento: I suinetti di entrambi i gruppi hanno ricevuto 1,5 cc di Forceris (Ceva Salute Animale S.P.A.) tramite iniezioni intramuscolari a 3 giorni di età.

I suinetti del gruppo controllo hanno ricevuto una dieta di controllo in mangiatoia, composta da mangime per suinetti in svezzamento standard, somministrato secondo le indicazioni del produttore.

I suinetti del gruppo trattamento hanno ricevuto MS TerraFeed Fe, come integratore alimentare, nello stesso tipo di mangiatoia. Questi suinetti hanno ricevuto un totale di 150-300 g/suinetto dal giorno 3 al giorno 21 (Tabella 1) a seconda della numerosità della nidiatae e della dimensione dei suinetti.

Inizio prova → Settimana Giorni	1							2							3						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	2 volte al giorno ¼ misurino piccolo (+/-25g per nidiata)			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●						
2 volte al giorno 1 misurino piccolo (+/-50g per nidiata)								●	●	●	●	●	●	●							
2 volte al giorno ¼ misurino grande (+/-75g per nidiata)															●	●	●	●	●		
2 volte al giorno 1 misurino grande (+/-150g per nidiata)																		●	●	●	●

*La dimensione della dose dipende dal numero di nidiata e dal peso corporeo della scrofa; se la dose del giorno precedente viene consumata completamente, la quantità di mangime deve essere aumentata il giorno successivo.*

**Tabella 1.** Schema di somministrazione di MS TerraFeed Fe per il gruppo di trattamento.  
**Table 1.** MS TerraFeed Fe feeding schedule for the treatment group.

Parametri misurati: Il peso corporeo (PV) iniziale dei suinetti è stato rilevato al giorno 7. Lo stesso giorno, ai suinetti è stata applicata una marca auricolare elettronica (UHF) per permetterne una identificazione certa durante l'esecuzione della prova. In seguito è stato misurato nuovamente il peso allo svezzamento (a 28 giorni di vita dei suinetti) e a 6 settimane dallo svezzamento (+/-70 giorni di età). La mortalità è stata registrata per nidiata prima dello svezzamento e per box dopo lo svezzamento.

## RISULTATI

I tassi di mortalità sono stati del 5% nel gruppo di controllo e del 4% nel gruppo di trattamento. L'uso di farmaci è stato basso (2%) sia nel gruppo di controllo che in quello di trattamento, senza differenze significative.

Il peso corporeo (PV) è risultato più alto ( $P < 0,05$ ) nel gruppo di trattamento rispetto al gruppo di controllo al giorno 28 e 70 (Tabella 2). Anche l'incremento ponderale medio giornaliero (IMG) è risultato più alto ( $P < 0,05$ ) nel gruppo di trattamento per il periodo pre-svezzamento, il periodo post-svezzamento e l'intero periodo di prova (Tabella 2).

	Controllo	MS TerraFeed Fe	p-Value
<b>PV al giorno 3 (Kg)</b>	1.9 ± 0.03	1.9 ± 0.03	0.713
<b>PV al giorno 28 (Kg)</b>	7.1 ± 0.12	7.4 ± 0.09	0.021
<b>PV al giorno 70 (Kg)</b>	24.7 ± 0.27	25.8 ± 0.22	0.001
<b>IMG periodo 3-28 (g/g)</b>	208 ± 4.0	219 ± 3.0	0.021
<b>IMG periodo 28-70 (g/g)</b>	420 ± 5.0	439 ± 5.0	0.006
<b>IMG periodo 3-70 (g/g)</b>	341 ± 4.0	357 ± 3.0	0.001

**Tabella 2.** Effetto dell'integrazione di un nuovo prodotto a base di torba arricchita di ferro nei suinetti lattanti (MS TerraFeed Fe) sulle prestazioni di crescita pre e post svezzamento  
**Table 2.** Effect of supplementing a novel iron-enriched peat-based product (MS TerraFeed Fe) to suckling piglets on pre-and postweaning growth performance

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'integrazione di un mangime a base di torba arricchito con ferro come MS TerraFeed Fe nei suinetti prima dello svezzamento ha un effetto positivo sulle loro prestazioni di crescita prima e dopo lo svezzamento in condizioni di campo in Spagna, con valori statisticamente significativi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G., Zhang, J. (2019). Diseases of Swine (11th edition). Wiley
2. Trckova, M., Matlova, L., Hudcova, H., Faldyna, M., Zraly, Z., Dvorska, L., Beran, V. & Pavlik, I. (2005). Peat as a feed supplement for animals: a literature review. Veterinární medicína, 50(8), 361
3. Van Hees, H.M.J., Davids, M., Maes, D., Millet, S., Possemiers, S., Den Hartog, L.A., van Kempen, T.A.T.G. & Janssens, G.P.J. (2019). Dietary fibre enrichment of supplemental feed modulates the development of the intestinal tract in suckling piglets. Journal of Animal Science and Biotechnology, 10, 1-11.
4. Visscher, C., Hankel, J., Nies, A., Keller, B., Galvez, E., Strowig, T., Keller, C. & Breves, G. (2019). Performance, fermentation characteristics and composition of the microbiome in the digest of piglets kept on a feed with humic acid-rich peat. Frontiers in Veterinary Science, 6, 29.

**PREMIO  
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2026  
VINCITORE**

# EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUZIONE DI PARASSITI DI RILEVANZA VETERINARIA E ZOONOTICA NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI DEL NORD ITALIA

## *EPIDEMIOLOGY AND DISTRIBUTION OF PARASITES OF ANIMAL-SPECIFIC AND ZOONOTIC IMPORTANCE IN PIG FARMS IN NORTHERN ITALY*

ALLIEVI C.

*Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, via dell'Università 6, 26900, Lodi, Italia*

**Parole chiave:** endoparassiti; zoonosi; allevamenti intensivi

**Key Words:** endoparasites; zoonoses; intensive pig farms

### **Riassunto**

La produzione suinicola in Italia si basa prevalentemente su allevamenti intensivi, dove le malattie parassitarie si manifestano in forma subclinica e ricevono scarsa attenzione. I parassiti possono comunque compromettere il benessere animale e causare perdite economiche dovute a ridotta crescita, maggiore consumo di mangime e sequestro di organi durante la macellazione. Alcuni hanno anche potenziale zoonotico, rappresentando un rischio per gli operatori della filiera. Un approccio efficace richiede strategie integrate, combinando interventi farmacologici e pratiche gestionali ottimizzate, considerate le crescenti resistenze agli antelmintici.

La prima linea di ricerca ha aggiornato i dati epidemiologici nei suini intensivi: su 880 campioni fecali, il 10,8% era positivo ad almeno un parassita, con il 63,6% delle aziende infette. Le lesioni epatiche da *Ascaris suum* sono state osservate nel 26,4% dei suini macellati e la sierologia per *Sarcoptes scabiei* ha mostrato una prevalenza dell'11,6%, correlata a categoria produttiva e biosicurezza aziendale.

La seconda linea ha caratterizzato molecularmente protozoi e microsporidi zoonotici (*Balantioides coli*, *Blastocystis* sp., *Enterocytozoon bieneusi*), rilevando un'elevata prevalenza per tutti e tre i parassiti.

La terza linea ha investigato la circolazione di parassiti in 191 cinghiali, con una prevalenza complessiva del 90,1%. I cinghiali rappresentano quindi serbatoi di parassiti per suini domestici.

### **Abstract**

Pig production in Italy is predominantly based on intensive farming, where parasitic diseases often occur subclinically and receive limited attention. Nevertheless, parasites can negatively impact animal welfare and cause economic losses due to reduced growth, increased feed consumption, and organ condemnation at slaughter. Some pig parasites also have zoonotic potential, posing a risk to workers along the production chain. Effective control requires integrated strategies combining pharmacological treatments with optimized management practices, particularly considering the growing issue of anthelmintic resistance.

The first research line updated epidemiological data in intensive pig farms: out of 880 fecal samples, 10.8% were positive for at least one parasite, with 63.6% of farms infected. Liver lesions indicative of *Ascaris suum* were observed in 26.4% of slaughtered pigs, with province and season being significant risk factors. Serology for *Sarcoptes scabiei* showed an overall prevalence of 11.6%, correlated with production category and farm biosecurity.

The second line molecularly characterized zoonotic protozoa and microsporidia (*Balantioides*

coli, *Blastocystis* sp., *Enterocytozoon bieneusi*), revealing high prevalence for all of them. The third line investigated parasites circulating in 191 wild boars, with 90.1% positive for at least one parasite. Wild boars thus represent significant reservoirs of parasites for domestic pigs, particularly in urban and peri-urban areas.

## INTRODUZIONE

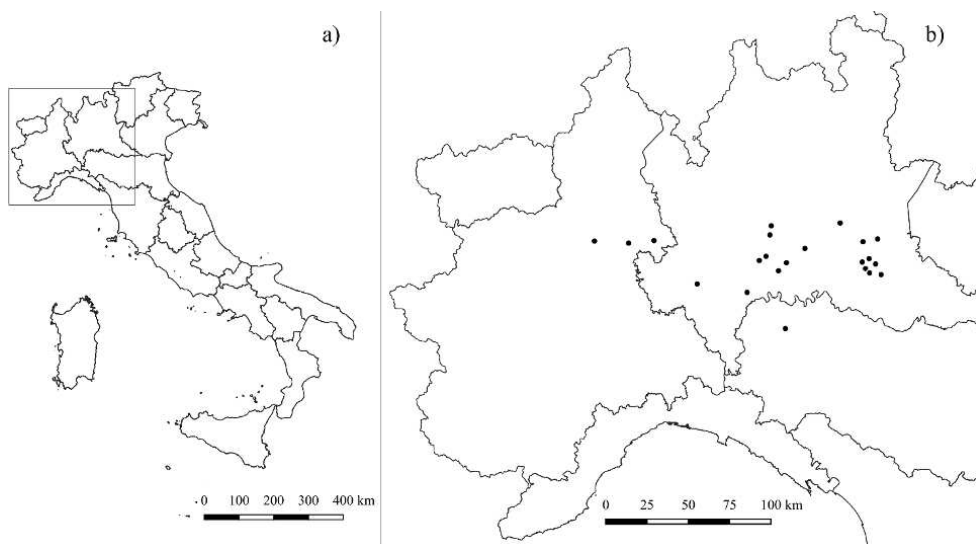
In Italia la produzione suinicola si basa su sistemi intensivi, prevalentemente confinati al chiuso. In questo contesto, le malattie parassitarie spesso si manifestano in forma subclinica, ricevendo minore attenzione da parte di allevatori e veterinari. Sebbene le forme oligosintomatiche siano predominanti, i parassiti possono causare una riduzione del benessere animale e provocare perdite economiche significative a causa di minore incremento ponderale, aumento del consumo di mangime e sequestro di organi durante le ispezioni post-mortem al macello [1–4]. Un ulteriore elemento di preoccupazione è il potenziale zoonotico di diversi parassiti suini, che possono rappresentare un rischio per la salute di chi lavora lungo la filiera alimentare, dal personale di allevamento agli operatori di macello. Le strategie di controllo devono mirare sia all'eliminazione dei parassiti dall'ospite sia alla riduzione della loro persistenza nell'ambiente. Considerando il crescente problema della resistenza agli antelmintici, un approccio efficace richiede una strategia integrata che combini interventi farmacologici con pratiche gestionali ottimizzate [3].

La revisione della letteratura scientifica ha evidenziato numerose lacune nell'epidemiologia dei parassiti negli allevamenti suinicoli italiani. Gli obiettivi principali di questo progetto di ricerca, articolato in linee specifiche, sono stati quindi:

- Aggiornare i dati epidemiologici sulla prevalenza dei parassiti.
- Valutare e caratterizzare molecolarmente protozoi e microsporidi zoonotici del tratto gastrointestinale dei suini.
- Indagare il ruolo dei cinghiali come reservoirs di parassiti per i suini domestici.

## MATERIALI E METODI

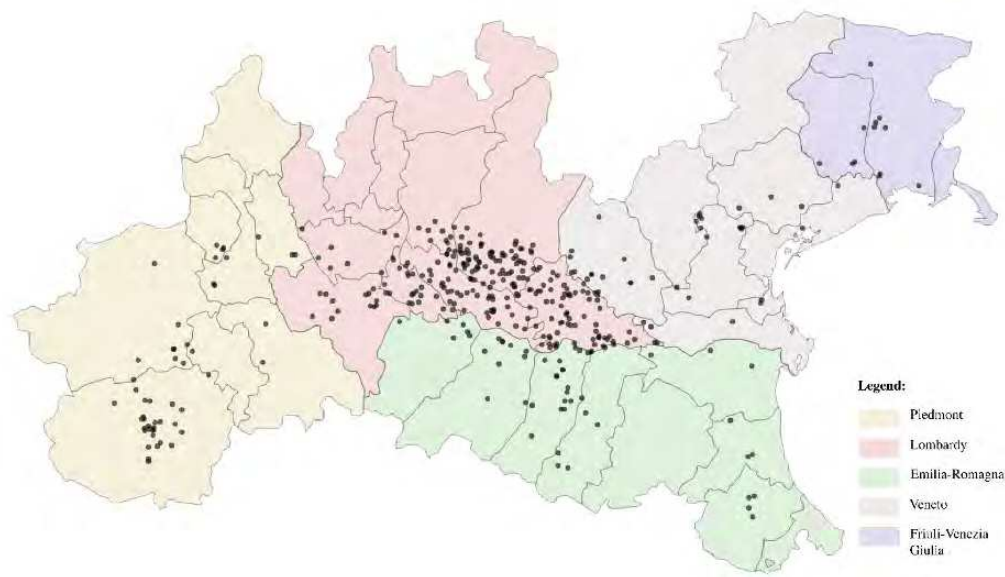
Gli allevamenti da ingrasso selezionati per il primo studio della prima linea di ricerca erano localizzati in diverse regioni: 18 in Lombardia, 3 in Piemonte e 1 in Emilia-Romagna (Figura 1).



**Figura 1** Distribuzione geografica degli allevamenti selezionati, realizzata con QGIS

Al momento del campionamento, i dati relativi alla gestione aziendale sono stati raccolti mediante la compilazione di un questionario. Per l'individuazione di oocisti di coccidi e di uova di elminti, i campioni fecali sono stati analizzati utilizzando la tecnica FLOTAC®. Sono state impiegate due soluzioni di flottazione, rispettivamente a base di cloruro di sodio e solfato di zinco. L'identificazione morfologica delle oocisti è stata eseguita dopo la sporulazione, utilizzando una soluzione di flottazione specifica [5]. Per l'identificazione delle uova di cestodi, il DNA è stato estratto dai campioni fecali risultati positivi ed è stata eseguita una PCR end-point mirata al gene NADH. I dati raccolti in ciascun allevamento sono stati valutati come fattori di rischio per l'insorgenza delle parassitosi e inseriti in modelli lineari generalizzati a effetti misti (GLMM).

Nel secondo studio sono stati esaminati i fegati di 754.833 suini macellati, allevati in 399 allevamenti situati in Nord Italia e prevalentemente destinati alla produzione di salumi, in uno dei più grandi macelli nazionali (Figura 2). Per ciascun allevamento sono stati raccolti dati relativi alla regione e alla provincia di allevamento, alla stagione dell'ispezione post-mortem, alla dimensione dell'allevamento e alla tipologia produttiva aziendale; la probabilità di riscontrare un animale positivo in relazione a tali fattori è stata stimata mediante un modello lineare generalizzato (GLM).



**Figura 2** Distribuzione geografica degli allevamenti inclusi nel secondo studio, generata con R Studio

Nel terzo studio, 370 sieri provenienti da 219 suini da ingrasso e 151 scrofe, provenienti da 23 allevamenti situati in Lombardia, sono stati analizzati per valutare la circolazione di *Sarcoptes scabiei*. Sono stati inoltre raccolti dati relativi alla gestione aziendale e a ciascun allevamento è stato assegnato un punteggio di biosicurezza compreso tra 1 (scarso), 2 (moderato) e 3 (ottimale). La rilevazione degli anticorpi IgG è stata effettuata mediante un test ELISA commerciale. Diversi GLM sono stati applicati per valutare l'effetto dei fattori gestionali sulla sieropositività.

Per quanto riguarda la seconda linea di ricerca, i campioni fecali sono stati raccolti seguendo lo stesso disegno sperimentale utilizzato nel primo studio della prima linea di ricerca. Sono stati considerati diversi aspetti aggiuntivi, in particolare la tipologia di acqua di abbeverata e il punteggio di pulizia degli animali, definito sulla base del grado di imbrattamento fecale del corpo, secondo lo schema proposto da ClassyFarm: 0, superficie corporea imbrattata  $\leq$  20%; 1, superficie corporea imbrattata compresa tra il 20% e il 50%; 2, superficie corporea imbrattata  $>$  50%. Per la ricerca del protozoo *Balantiodes coli*, tutti i campioni fecali sono stati analizzati mediante due tecniche copromicroscopiche: la tecnica di sedimentazione e la tecnica FLOTAC®. Il coefficiente kappa di Cohen è stato calcolato per valutare il grado di concordanza tra le tecniche copromicroscopiche utilizzate. L'estrazione del DNA è stata eseguita su 22 campioni fecali positivi alla presenza di cisti di *B. coli* utilizzando la tecnica di sedimentazione. I campioni di DNA sono stati quindi sottoposti a PCR convenzionale, e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle disponibili nelle banche dati.

Per l'individuazione di *Enterocytozoon bienersi*, l'estrazione del DNA è stata eseguita su 440 campioni fecali. I campioni di DNA sono stati successivamente sottoposti a un protocollo di PCR nested e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle disponibili nei database. L'analisi filogenetica è stata effettuata mediante il software MEGA-X. I dati relativi alla gestione aziendale e il punteggio di pulizia degli animali sono stati valutati come fattori di rischio per la presenza di *E. bienersi* e inseriti in GLM.

Per *Blastocystis* sp., un totale di 132 campioni fecali è stato selezionato per le analisi molecolari. I campioni sono stati sottoposti a Next-Generation Sequencing (NGS), utilizzando un approccio sviluppato presso il Laboratorio di Parassitologia dello Statens Serum Institut (Copenaghen, Danimarca). Tale metodologia prevede una prima amplificazione PCR mediante primer universali e una seconda amplificazione per l'aggiunta degli adattatori Illumina.

Per quanto riguarda la terza linea di ricerca, 191 campioni fecali sono stati raccolti dalle carcasse di cinghiale durante le ispezioni post-mortem obbligatorie presso un centro di lavorazione della selvaggina, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. I campioni sono stati analizzati mediante FLOTAC® e le oocisti di coccidi sono state identificate dopo la sporulazione. Il protozoo zoonotico *B. coli* è stato rilevato mediante la tecnica di sedimentazione. I campioni positivi alla presenza di uova di strongili sono stati incubati a 25 °C per 10 giorni; le larve di terzo stadio sono state quindi recuperate e identificate mediante analisi morfologiche e molecolari.

## **RISULTATI**

Nel primo studio della prima linea di ricerca, l'analisi copromicroscopica ha rilevato che 95 campioni su 880 (10,8%) erano positivi per almeno un taxon parassitario, con il 63,6% (14/22) delle aziende risultate infette. Fattori gestionali aziendali, come l'applicazione del sistema all-in/all-out e la dimensione dell'allevamento, erano significativamente associati alla prevalenza parassitaria (Tabella 1).

**Tabella 1** Prevalenza dei parassiti gastrointestinali rilevati in ciascuna sessione di campionamento negli allevamenti di suini da ingrasso del nord Italia

Parassiti identificati	Sessione di campionamento	Aziende positive		Campioni positivi	
		N°	Prevalenza % (95% CI) <sup>a</sup>	N°	Prevalenza % (95% CI)
<i>Ascaris suum</i>	T1	3/22	13.6 (3.1–35.1)	10/440	2.3 (1.1–4.1)
	T2	9/22	40.9 (20.7–63.6)	57/440	12.9 (10–16.5)
	Totale	10/22	45.4 (24.4–67.8)	67/880	7.6 (5.9–9.6)
<i>Cystoisospora suis</i>	T1	3/22	13.6 (3.1–35.1)	7/440	1.6 (0.6–3.2)
	T2	1/22	4.5 (0.1–22.8)	1/440	0.2 (0.01–1.3)
	Totale	3/22	13.6 (3.1–35.1)	8/880	0.9 (0.3–1.8)
<i>Trichuris suis</i>	T1	4/22	18.2 (5.2–40.3)	6/440	1.4 (0.5–2.9)
	T2	4/22	18.2 (5.2–40.3)	9/440	2 (0.9–3.8)
	Totale	6/22	27.3 (10.7–50.2)	15/880	1.7 (1–2.8)
Hymenolepididae	T1	3/22	13.6 (3.1–35.1)	8/440	1.8 (0.8–3.5)
	T2	5/22	22.7 (7.8–45.4)	8/440	1.8 (0.8–3.5)
	Totale	6/22	27.3 (10.7–50.2)	16/880	1.8 (1–2.9)
<b>Totale</b>	T1	10/22	45.4 (24.4–67.8)	26/440	5.9 (3.9–8.5)
	T2	12/22	54.5 (32.2–75.6)	69/440	15.7 (12.4–19.4)
	Prevalenza complessiva	14/22	63.6 (40.7–82.8)	95/880	10.8 (8.8–13)

<sup>a</sup>CI = Intervallo di Confidenza

Le lesioni milk spots (Figura 3) sono state osservate nel 92,2% delle aziende e nel 26,4% dei suini macellati, con provincia di allevamento e stagione dell'ispezione post-mortem come fattori di rischio significativi.



**Figura 3** Immagine di un fegato sequestrato al macello con numerose milk spots evidenziabili sulla superficie dell'organo

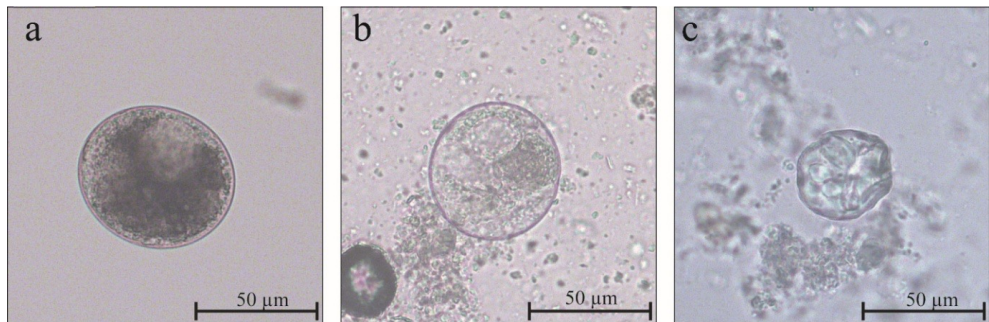
Per quanto riguarda *S. scabiei*, la sieroprevalenza complessiva era dell'11,6%. L'analisi statistica ha mostrato associazioni significative tra infestazione, categoria produttiva e punteggi di biosicurezza aziendale (Tabella 2).

**Tabella 2** Prevalenza degli anticorpi antiSarcoptes scabiei var. suis a livello di allevamento e analisi multivariata dei fattori di rischio associati alla sieroprevalenza di Sarcoptes scabiei var. suis in suini da ingrasso e scrofe

Variabile risposta	Categoria	N° aziende positive/Totale	P% (95% CI)	OR <sup>a</sup> (95% CI)	p-value
Categoria produttiva	Suini da ingrasso	6/15	40.0% (16.3–67.7)	1 (rif.)	
	Scrofe	10/11	90.9% (58.7–99.8)	1.6 (1.3–1.9)	0.000*
Score sanitario	1	3/3	100 (29.2–100)	1 (rif.)	
	2	9/14	64.3 (35.1–87.2)	0.7 (0.5–0.9)	0.038*
	3	4/9	44.4 (13.7–78.8)	0.7 (0.5–1.0)	0.050*

<sup>a</sup>OR = Odds Ratio

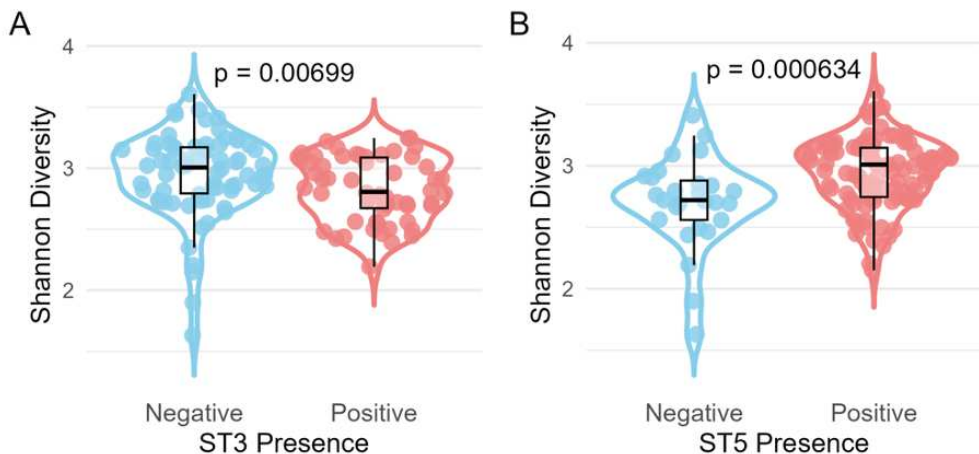
Per *B. coli* (Figura 4) è stata registrata un'alta prevalenza (92,4%) e l'analisi delle sequenze ha evidenziato la presenza di entrambi i tipi genetici ITS (A e B), con predominanza del tipo B.



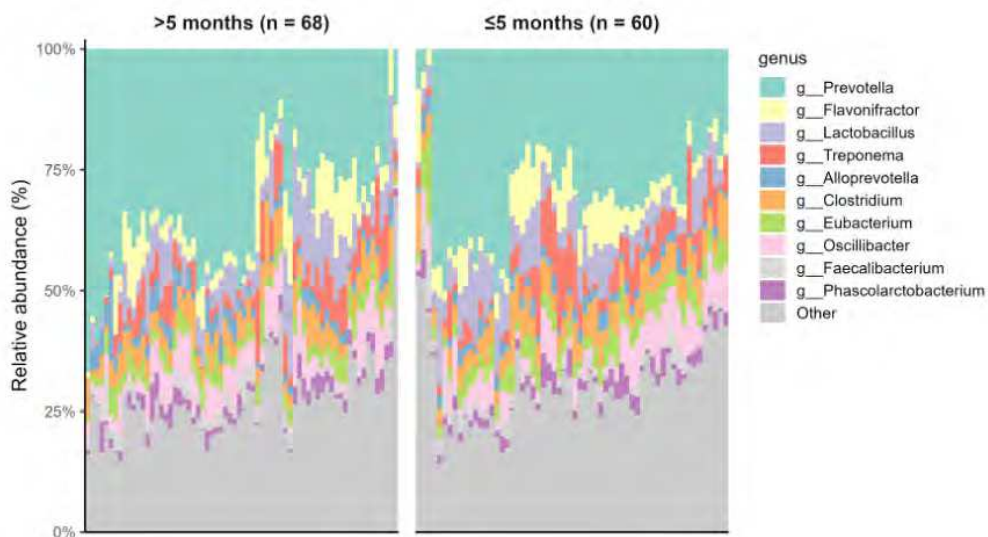
**Figura 4** Cisti di *Balantioides coli* isolate da campioni fecali utilizzando diverse tecniche copromicroscopiche. A) Cisti isolata mediante tecnica di sedimentazione. B) Cisti isolata mediante tecnica FLOTAC® utilizzando una soluzione a base di NaCl (cloruro di sodio). C) Cisti isolata mediante tecnica FLOTAC utilizzando una soluzione a base di  $ZnSO_4$  (zincio solfato).

Per *E. bieneyi*, la prevalenza complessiva è stata del 63,4%, con età e grado di imbrattamento fecale significativamente associati all'infezione. La caratterizzazione molecolare ha identificato diversi genotipi, inclusi due genotipi con documentato potenziale zoonotico, precedentemente segnalati nell'uomo.

*Blastocystis sp.* è stato rilevato in tutti gli animali campionati, con infezioni singole e miste dei sottotipi ST1, ST2, ST3, ST5 e ST15. Ad eccezione di ST15, tutti gli altri sottotipi sono considerati zoonotici. ST5 è risultato il più prevalente e la sua frequenza aumentava con l'età, suggerendo un'associazione tra microbiota intestinale del suino e acquisizione naturale di ST5, raramente riscontrato nell'uomo (Figura 5, Figura 6).

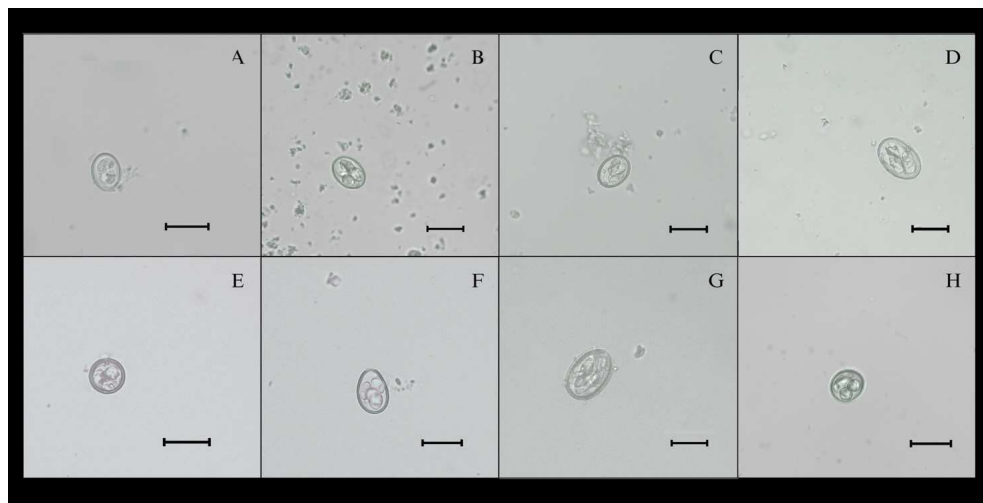


**Figura 5** Indice di diversità di Shannon per valutare la ricchezza della comunità batterica nei campioni positivi a *Blastocystis sp.* ST3 (A) e ST5 (B)



**Figura 6** Grafico a barre impilate che mostra l'abbondanza relativa dei 10 principali generi batterici, raggruppati per età (>5 mesi vs. ≤5 mesi)

Relativamente allo studio riguardante i cinghiali, un totale di 172 su 191 animali (90,1%) è risultato positivo per almeno un taxon parassitario, con associazione significativa tra età e prevalenza di *A. suum* e *B. coli*. Sono state inoltre fornite chiavi morfologiche e morfometriche aggiornate per diverse specie di coccidi (Figura 7) e per le larve di terzo stadio del nematode *Globocephalus urosubulatus*, supportate dalla caratterizzazione molecolare.



**Figura 7** Principali specie di coccidi identificate nei cinghiali cacciati nel nord Italia. A) *Cystoisospora suis*. B) *Eimeria deblickei*. C) *Eimeria neodeblickei*. D) *Eimeria polita*. E) *Eimeria polita*. F) *Eimeria perminuta*. G) *Eimeria porci*. H) *Eimeria suis*. Scale bar di 20  $\mu$ m per tutte le immagini.

## DISCUSSIONE

Il Nord Italia ospita la maggior parte del patrimonio suinicolo nazionale, allevato sia con sistemi intensivi sia estensivi, garantendo significativa redditività economica [6]. In questo contesto, l'implementazione di strategie gestionali adeguate e protocolli igienico-sanitari è cruciale per ridurre la circolazione dei parassiti lungo l'intera filiera. La resistenza antimicrobica e antiparassitaria rappresenta una minaccia significativa per l'uomo, gli animali e l'ambiente. La diffusione dei geni di resistenza può compromettere progressivamente l'efficacia dei trattamenti, ridurre le opzioni terapeutiche e incidere negativamente sul benessere animale. Un'ulteriore criticità è la tendenza di allevatori e veterinari a sottovalutare la prevalenza dei parassiti, minimizzandone spesso il potenziale patogeno e l'impatto economico associato [7–9].

I risultati della prima linea di ricerca hanno dimostrato che i principali parassiti gastrointestinali, come *A. suum*, e gli ectoparassiti, in particolare *S. scabiei*, persistono in numerosi allevamenti intensivi e possono causare perdite economiche rilevanti. Stime americane indicano costi annui di 17,5 milioni di dollari per il sequestro di organi e 60,1 milioni di dollari per ridotta crescita giornaliera e inefficienza alimentare nei suini affetti da lesioni da ascaridi [10–13]. Analogamente, per *S. scabiei*, il carico economico annuo per allevatore varia tra 84 e 115 dollari per scrofa infestata, sottolineando l'importanza economica della gestione parassitaria [14–16].

La seconda linea di ricerca ha analizzato la circolazione dei protozoi *B. coli* e *Blastocystis* sp. e del microsporidio *E. bienersi* nel Nord Italia. A oggi, gli studi epidemiologici su questi parassiti sono limitati, così come le informazioni sulla loro patogenicità e rilevanza zoonotica. Per *B. coli*, è stata registrata elevata prevalenza sia all'inizio sia alla fine del ciclo di ingrasso [17–18]. Analoghe considerazioni si applicano a *E. bienersi*, con alta prevalenza sia nei suini giovani sia in quelli prossimi alla macellazione. Tutti i genotipi identificati appartengono al Gruppo 1, che comprende i principali genotipi zoonotici. L'età e il grado di imbrattamento fecale rappresentano due importanti fattori di rischio, con prevalenze più elevate negli animali giovani e in quelli maggiormente imbrattati [19–20].

Per *Blastocystis* sp., sono state impiegate metodiche di metabarcoding basate su sequenziamento di nuova generazione (NGS). Il parassita è stato rilevato in tutti gli animali campionati. Gli adulti tendevano a ospitare prevalentemente il sottotipo ST5, suggerendo che la colonizzazione richieda un microbiota intestinale maturo, con comunità microbiche più ricche. Inoltre, la presenza di nematodi aumentava con l'età e con l'espressione di ST5, evidenziando l'interesse per studi futuri su questa correlazione [21–23].

La terza linea di ricerca ha coinvolto cinghiali cacciati vicino ai siti di campionamento dei suini domestici. È stata rilevata ampia circolazione di parassiti, inclusi elminti e protozoi comuni nei suini (*A. suum*, *B. coli*, coccidi) e altri meno frequenti (*Ascarops strongylina*, *Capillaria* spp., *Globocephalus urosubulatus*, *Metastrongylus* spp., *Strongyloides ransomi*). La presenza di questo ampio spettro di parassiti solleva interrogativi sui rischi di trasmissione ai suini domestici [24].

### Conclusioni

I risultati ottenuti dalle linee di ricerca sviluppate durante il mio dottorato hanno contribuito ad aggiornare le conoscenze nazionali sui parassiti dei suini, in particolare elminti, acari, protozoi e microsporidi, di rilevanza veterinaria e per la salute pubblica, con un focus specifico anche sui parassiti del cinghiale. È stato dimostrato che i parassiti continuano a circolare negli allevamenti intensivi, causando rilevanti perdite economiche a seguito della comparsa di sintomi clinici, della ridotta crescita e incremento ponderale, nonché del sequestro di organi in macello.

Per quanto riguarda la prima linea di ricerca, studi futuri applicheranno specifici protocolli di

biosicurezza e igiene nelle aziende incluse nel progetto, con l'obiettivo di ridurre la circolazione dei parassiti agendo sui fattori di rischio identificati. Nel caso di *A. suum*, la circolazione sarà monitorata anche mediante tecniche sierologiche, integrate con analisi copromicroscopiche e valutazione delle lesioni epatiche al macello. Per *S. scabiei*, saranno impiegati ulteriori approcci diagnostici, inclusi raschiati cutanei e scoring delle lesioni dermatologiche, al fine di ottenere una comprensione più completa della distribuzione epidemiologica.

Relativamente a *B. coli*, *Blastocystis* sp. ed *E. bienersi*, studi futuri approfondiranno i meccanismi di ingresso di questi endoparassiti nelle aziende: il campionamento sarà esteso ad altre categorie produttive e a diverse matrici, come acqua potabile somministrata agli animali e fonti idriche originali (acquedotto o pozzo). Inoltre, sarà posta attenzione a definire la loro reale patogenicità attraverso il monitoraggio degli animali infetti nel tempo, valutando lo sviluppo di segni clinici ed escludendo il coinvolgimento di altri agenti eziologici di diarrea. Saranno infine condotte indagini sulla possibile trasmissione zoonotica dagli animali all'uomo, mediante raccolta di campioni fecali da allevatori e operatori della filiera.

Per quanto riguarda i cinghiali, indagini future esploreranno il loro ruolo nella diffusione di elementi parassitari altamente resistenti in ambiente. A tal fine, saranno selezionate aziende in cui gli animali sono allevati all'aperto o hanno accesso regolare all'esterno, dove il rischio di contatto con la fauna selvatica è più elevato.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Andres VM, Davies RH (2015). Biosecurity measures to control Salmonella and other infectious agents in pig farms: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14:317–335.
2. Bottoms K, Poljak Z, Dewey C, Deardon R, Holtkamp D, Friendship R (2013). Evaluation of external biosecurity practices on southern Ontario sow farms. *Prev. Vet. Med.* 109:58–68.
3. Pettersson E, Sjölund M, Wallgren T, Osterman Lind E, Höglund J, Wallgren P (2021). Management practices related to the control of gastrointestinal parasites on Swedish pig farms. *Porcine Health Manag.* 7:12.
4. Simon-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, García-Bocanegra I, Martín M, Mateu E, Casal J (2013). Biosecurity practices in Spanish pig herds: perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. *Prev. Vet. Med.* 110:223–231.
5. Joachim A, Schwarz L (2015). Coccidia of Swine: Eimeria species, Cystoisospora (syn. Isospora) suis. In: Mehlhorn, H (ed) *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–5.
6. Bottacini M, Scollo A, Edwards SA, Contiero B, Veloci M, Pace V, Gottardo F (2018). Skin lesion monitoring at slaughter on heavy pigs (170 kg): Welfare indicators and ham defects. *PLoS ONE* 13:e0207115.
7. Carstensen L, Vaarst M, Roepstorff A (2002). Helminth infections in Danish organic swine herds. *Vet. Parasitol.* 106:253–264.
8. Knecht D, Popiołek M, Zalesny G (2011). Does meatiness of pigs depend on the level of gastro-intestinal parasites infection? *Prev. Vet. Med.* 99:234–239.
9. Joachim A, Dülmer N, Dauschies A, Roepstorff A (2001). Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. *Vet. Parasitol.* 96:135–146.
10. Boes J, Kanora A, Havn KT, 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.
11. Goodall EA, McLoughlin EM, Menzies FD, McIlroy S (1991). Time series analysis of the prevalence of *Ascaris suum* infections in pigs using abattoir condemnation data. *Anim. Prod.* 53:367–372.

12. Sanchez-Vazquez MJ, Smith RP, Kang S, Lewis F, Nielen M, Gunn GJ, Edwards SA (2010). Identification of factors influencing the occurrence of milk spot livers in slaughtered pigs: A novel approach to understanding *Ascaris suum* epidemiology in British farmed pigs. *Vet. Parasitol.* 173:271–279.
13. Bernardo TM, Dohoo IR, Ogilvie T (1990). A critical assessment of abattoir surveillance as a screening test for swine ascariasis. *Can. J. Vet. Res.* 54:274–277.
14. Alonso de Vega F, Mendez de Vigo J, Ortiz Sanchez J, Martinez-Carrasco Pleite C, Albaladejo Serrano A, Ruiz de Ybañez Carnero MR (1998). Evaluation of the prevalence of sarcoptic mange in slaughtered fattening pigs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 76:203–209.
15. Goyena E, Ruiz de Ybañez R, Martínez-Carrasco C, Balseiro A, Alonso de Vega F, Casais R, Prieto M, García-Marín JF, Berriatua E (2013). On the aggregated nature of chronic *Sarcoptes scabiei* infection in adult pigs. *Vet. Parasitol.* 192:301–306.
16. Rambozzi L, Menzano A, Molinar Min AR, Rossi L (2007). Immunoblot analysis of IgG antibody response to *Sarcoptes scabiei* in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115:179–83.
17. Almaw A, Berhan A, Solomon Y, Malkamu B, Eyayu T, Workineh L, Mekete G, Yayehrad AT (2022). *Balantidium coli*; rare and accidental finding in the urine of pregnant woman: case report. *Int. Med. Case Rep. J.* 15:105–109.
18. Ponce-Gordo F, García-Rodríguez JJ (2021). *Balantioides coli*. *Res. Vet. Sci.* 135:424–431.
19. Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie R, Dearen T, Leon ET, Xiao L (2012). Molecular epidemiologic characterization of *Enterocytozoon bienewisi* in HIV-infected persons in Benin City, Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86:441–445.
20. Zhao W, Zhang W, Yang F, Cao J, Liu H, Yang D, Shen Y, Liu A (2014). High prevalence of *Enterocytozoon bienewisi* in asymptomatic pigs and assessment of zoonotic risk at the genotype level. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:3699–3707.
21. Ajjampur SS, Tan KS (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitol. Int.* 65:772–779.
22. Andersen LO, Stensvold CR (2016). *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *J. Clin. Microbiol.* 54:524–528.
23. Seijas-Pereda L, Köster PC, Dashti A, Bailo B, Guadano-Procesi I, Rescalvo-Casas C, Hernando-Gozalo M, Cuadros-González J, Carmena D, Pérez-Tanoira R (2025). Intragenomic diversity of the small subunit rDNA gene shows limited impact on the pathogenicity of *Blastocystis* infection in clinical patients. *Microbes Infect.* 27:105422.
24. Moretta I, Veronesi F, Di Paola R, Battistacci L, Moretti A (2011). Parasitological survey on wild boar (*Sus scrofa*) shot in the hunting season 2009–2010 in Umbria (central Italy). *Large Anim. Rev.* 17:187–192.

**PREMIO  
FORMAZIONE PROFESSIONALE ITALIA 2025**

# VACCINAZIONE LAWSONIA INTRACELLULARIS

## *LAWSONIA INTRACELLULARI VACCINATION*

SALVIANI A.

*Crinvet sas, Via Erneso Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia*

**Parole chiave:** vaccinazione, Lawsonia intracellularis, costi

**Keywords:** vaccinations, Lawsonia intracellularis, costs

### **Riassunto:**

*Lawsonia intracellularis* è un batterio Gram-negativo responsabile dell'enteropatia proliferativa, una patologia che colpisce principalmente il suino ma che può interessare anche altre specie. Il microorganismo infetta gli enterociti immaturi delle cripte intestinali, soprattutto a livello dell'ileo, inducendo una marcata iperplasia della mucosa. Ne consegue un ispessimento della parete intestinale con riduzione della capacità di assorbimento e quindi un impatto negativo sulle performance produttive.

Dal punto di vista clinico, l'infezione può manifestarsi in forma subclinica, con rallentamento dell'accrescimento e peggioramento dell'indice di conversione alimentare, oppure in forma acuta emorragica, potenzialmente fatale. La trasmissione avviene per via oro-fecale ed è favorita da elevate densità di allevamento. La diagnosi si basa su PCR, sierologia e immunistochemica.

La vaccinazione rappresenta uno strumento centrale nel controllo della malattia. L'impiego di vaccini, vivi attenuati o inattivati, contribuisce a ridurre la gravità dei segni clinici e l'escrezione batterica, migliorando le performance produttive degli animali. Questo si traduce in minori perdite produttive, riduzione dei costi legati ai trattamenti antimicrobici e migliore efficienza di crescita, con un impatto positivo sulla redditività complessiva dell'allevamento.

### **Abstract**

*Lawsonia intracellularis* is a Gram-negative bacterium responsible for proliferative enteropathy, a disease that primarily affects pigs but may also involve other species. The microorganism infects immature enterocytes within the intestinal crypts, particularly at the ileal level, inducing marked mucosal hyperplasia. This results in thickening of the intestinal wall, reduced absorptive capacity, and consequently a negative impact on productive performance.

From a clinical standpoint, the infection may present in a subclinical form, characterized by reduced growth rate and worsening of feed conversion ratio, or in an acute hemorrhagic form, which can be potentially fatal. Transmission occurs via the oro-fecal route and is favored by high stocking densities. Diagnosis is based on PCR, serology, and immunohistochemistry.

Vaccination represents a central tool in controlling the disease. The use of vaccines, whether live attenuated or inactivated, helps reduce the severity of clinical signs and bacterial shedding, improving the productive performance of the animals. This results in lower production losses, reduced costs related to antimicrobial treatments, and improved growth efficiency, ultimately having a positive impact on the overall profitability of the farm.

## INTRODUZIONE

L'enteropatia proliferativa suina (Porcine Proliferative Enteropathy, PPE), causata dal batterio intracellulare obbligato *Lawsonia intracellularis*, è riconosciuta come una delle più rilevanti patologie enteriche dell'allevamento suino intensivo a livello mondiale. Fin dalle prime descrizioni sistematiche della malattia (McOrist S et Lawson GH, 1993), la PPE è stata identificata come una condizione ad elevato impatto sanitario ed economico, caratterizzata da un'ampia variabilità clinica e da una distribuzione endemica nella maggior parte dei sistemi produttivi. Nonostante i progressi nella comprensione della patogenesi e dell'epidemiologia, rimangono ancora aspetti irrisolti riguardanti le dinamiche di infezione, l'immunità protettiva e la quantificazione precisa delle perdite economiche associate, come sottolineato da Jacobson M. et al. (2010).

Dal punto di vista patogenetico, *L. intracellularis* infetta selettivamente gli enterociti immaturi delle cripte intestinali, inducendo una marcata iperplasia dell'epitelio e un'alterazione dell'architettura mucosale. Questo processo compromette l'assorbimento dei nutrienti, altera l'equilibrio idro-elettrolitico e determina quadri clinici variabili, dalla diarrea cronica con riduzione delle performance alla forma emorragica acuta, potenzialmente fatale nei suini in accrescimento e ingrasso. Tuttavia, l'aspetto più insidioso della malattia è rappresentato dalle infezioni subcliniche, nelle quali l'assenza di segni evidenti non esclude un impatto significativo sull'incremento medio giornaliero (Average Daily Gain, ADG) e sull'efficienza alimentare.

Studi sperimentali hanno dimostrato la capacità del patogeno di instaurare infezioni persistenti con escrezione fecale prolungata, contribuendo al mantenimento dell'infezione a livello di allevamento (Smith S.H. et McOrist S., 1997). Ulteriori evidenze indicano che, dopo la guarigione clinica, i suini possono sviluppare una protezione parziale alla reinfezione, suggerendo un ruolo rilevante dell'immunità acquisita ma anche la possibilità di cicli infettivi ripetuti in condizioni di campo (Collins A.M. et Love R.J., 2007). La risposta immunitaria coinvolge sia meccanismi celluloso-mediati sia umorali, con differenze osservabili tra infezione naturale e somministrazione di ceppi vaccinali attenuati (Guedes R.M.C. et Gebhart C.J., 2003), elemento cruciale per comprendere il razionale biologico della vaccinazione.

L'introduzione di tecniche molecolari quantitative, in particolare la real-time PCR (qPCR), ha rappresentato un progresso sostanziale nella diagnostica della PPE, consentendo la rilevazione e la quantificazione della carica batterica fecale con elevata sensibilità e specificità (Wattanaphansak S. et al., 2010; Nathues H. et al., 2009; Richter et al., 2010). Tali strumenti hanno permesso di correlare in modo più preciso i livelli di escrezione con i parametri clinici e produttivi, evidenziando come anche basse o moderate cariche batteriche possano associarsi a una riduzione dell'ADG. Parallelamente, lo sviluppo di test sierologici ELISA per la diagnosi di allevamento (Boesen et al., 2005) ha rafforzato le strategie di monitoraggio epidemiologico.

Dal punto di vista economico, l'infezione da *L. intracellularis* comporta perdite dirette e indirette. Le prime includono riduzione della crescita, peggioramento dell'indice di conversione alimentare, aumento della mortalità nelle forme acute e costi terapeutici. Le seconde comprendono l'aumento della variabilità ponderale all'interno dei lotti, il prolungamento dei tempi di permanenza in ingrasso, l'incremento dei giorni al macello e l'uso di antimicrobici, con implicazioni sia economiche sia legate all'antimicrobico-resistenza. Come evidenziato da McOrist S (2005), il costo complessivo della PPE endemica è spesso sottostimato, poiché le infezioni subcliniche generano perdite cumulative difficilmente quantificabili senza un approccio analitico strutturato.

**Tabella 1:** Relazione tra infezione da *Lawsonia intracellularis* e impatto economico.

<b>Fase / Condizione</b>	<b>Evidenze biologiche</b>	<b>Effetti produttivi</b>	<b>Impatto economico diretto</b>	<b>Impatto economico indiretto</b>
Infezione sub-clinica	Escrezione fecale intermittente o persistente (qPCR positiva)	Riduzione dell'ADG; peggioramento FCR; eterogeneità degli animali	Minore peso finale; aumento giorni di allevamento	Maggiore variabilità di macellazione; penalità di filiera
Infezione clinica	Diarrea; iperplasia intestinale; carica batterica elevata	Marcata riduzione ADG; ridotta efficienza alimentare	Costi trattamenti; incremento consumo mangime/kg accrescimento	Maggiore uso di antimicrobici; rischio resistenze
Forma emorragica acuta	Lesioni intestinali gravi; mortalità improvvisa	Perdita improvvisa di soggetti in accrescimento/ finissaggio	Mortalità; perdita investimento animale	Instabilità produttiva; costi di gestione emergenza

In questo scenario, la vaccinazione contro *Lawsonia intracellularis* rappresenta una strategia preventiva chiave, finalizzata a ridurre l'escrezione fecale, limitare la diffusione del patogeno e migliorare le performance produttive. L'esperienza maturata con altre infezioni suine sistemiche, come il PCV2, per la quale meta-analisi hanno dimostrato un miglioramento significativo dell'ADG e una riduzione della mortalità a seguito della vaccinazione (Kristensen CS et al., 2011), evidenzia l'importanza di valutazioni economiche rigorose delle strategie immunoprofilattiche.

Nonostante l'ampia diffusione della vaccinazione nei sistemi produttivi intensivi, permane la necessità di integrare dati clinici, microbiologici e produttivi all'interno di modelli epidemiologici avanzati, capaci di considerare misure ripetute e variabili confondenti (Dohoo et al., 2009). Una stima accurata del ritorno economico della vaccinazione richiede infatti un'analisi che tenga conto dell'interazione tra carica batterica, manifestazioni cliniche, parametri di crescita e contesto gestionale di allevamento.

Alla luce di queste considerazioni, una valutazione sistematica e quantitativa dell'impatto economico della vaccinazione contro *Lawsonia intracellularis* risulta fondamentale per supportare decisioni basate sull'evidenza scientifica, ottimizzare l'allocazione delle risorse sanitarie e migliorare la sostenibilità economica e sanitaria della produzione suinicola moderna.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso un'azienda suinicola situata nella provincia di Cuneo, specializzata nell'allevamento di suini da ingrasso destinati alla produzione di Prosciutto di Parma DOP.

La consistenza complessiva dell'allevamento è pari a circa 6.000 capi, gestiti secondo sistema "tutto pieno-tutto vuoto", al fine di garantire elevati standard di biosicurezza e un'appropriata gestione sanitaria dei cicli produttivi. La struttura aziendale è articolata in cinque capannoni di ingrasso: quattro con capacità di circa 1.300 capi ciascuno e uno con capacità di circa 450 capi.

Il piano alimentare prevede la somministrazione di mangime commerciale proveniente da mangimificio esterno, associato all'integrazione con siero di latte secondo uno schema progressivo: 50% di siero fino al raggiungimento di 90 kg di peso vivo e 100% di siero nel periodo compreso tra 90 e 120 kg di peso vivo. Tale regime alimentare è stato mantenuto costante nei gruppi oggetto di studio.

Sono state analizzate le performance zootecniche di due gruppi di suini allevati nella medesima struttura produttiva, in condizioni gestionali sovrapponibili e con identica linea genetica, ma in periodi temporali differenti.

### **Gruppo 1 – Non vaccinati contro *Lawsonia intracellularis***

Il Gruppo 1 comprende 1.285 suini allevati nel Capannone 2 nel periodo compreso tra il 7 ottobre 2022 e aprile 2023, distribuiti su due diversi cicli produttivi.

I soggetti appartengono alla linea genetica Goland C21 e non sono stati sottoposti a vaccinazione nei confronti di *Lawsonia intracellularis*.

Il protocollo sanitario aziendale prevedeva tuttavia la vaccinazione contro:

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP)
- Influenza suina

I dati relativi a questo gruppo rappresentano dati storici aziendali delle performance medie registrate nel periodo indicato.

### **Gruppo 2 – Vaccinati contro *Lawsonia intracellularis***

Il Gruppo 2 comprende 1.225 suini allevati nel medesimo Capannone 2 nel periodo compreso tra il 6 luglio 2023 e il 15 febbraio 2024.

Anche in questo caso gli animali appartengono alla linea genetica Goland C21. I suini sono stati vaccinati contro *Lawsonia intracellularis* mediante somministrazione per via orale di vaccino vivo attenuato, secondo le indicazioni del produttore.

Analogamente al gruppo controllo, il protocollo sanitario includeva la vaccinazione contro:

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP)
- Influenza suina

Poiché i due gruppi sono stati allevati in periodi temporali differenti, l'effetto "anno/ciclo produttivo" è stato considerato nella valutazione dei risultati come potenziale fattore confondente.

## RISULTATI

Nel gruppo vaccinato contro *L. intracellularis*, il peso medio all'arrivo era pari a 22,9 kg, mentre il peso medio alla macellazione ha raggiunto 169,3 kg. La durata del ciclo produttivo è stata di 200 giorni. L'indice di conversione alimentare (ICA) è risultato pari a 2,74 e l'incremento medio ponderale giornaliero (IMPG) di 732 g/die. La mortalità complessiva registrata è stata del 6,15%. I costi medi per trattamenti sanitari, comprensivi di tutti i vaccini, sono risultati pari a 11,80 € per capo.

L'analisi dettagliata della mortalità nel gruppo vaccinato ha evidenziato che lo 0,57% dei soggetti è deceduto per torsione intestinale, il 3,2% è stato abbattuto o scartato a seguito di

episodi di cannibalismo (principalmente morsicature della coda), mentre lo 0,9% è attribuibile a morte improvvisa.

Nel gruppo non vaccinato, il peso medio all'arrivo era pari a 35,4 kg e il peso medio alla macellazione a 169,9 kg, con una durata del ciclo produttivo di 190 giorni. L'ICA è risultato pari a 2,85, mentre l'IMPG si è attestato a 708,3 g/die. La mortalità complessiva è stata del 3,60% e i costi medi dei trattamenti sanitari sono risultati pari a 5,32 € per capo.

Nel dettaglio, nel gruppo non vaccinato lo 0,46% dei decessi è stato attribuito a torsione intestinale (HBS), lo 0,85% ad abbattimenti o scarti e lo 0,4% a morte improvvisa.

Nel complesso, il gruppo vaccinato ha mostrato un miglioramento delle performance produttive, evidenziato da un indice di conversione più favorevole (2,74 vs 2,85) e da un incremento medio giornaliero superiore (+23,7 g/die). Tuttavia, tali risultati sono stati accompagnati da una maggiore mortalità e da costi terapeutici più elevati, principalmente riconducibili agli episodi di cannibalismo, evento non direttamente correlabile all'infezione da *L. intracellularis*.

È inoltre opportuno considerare che la differenza nel peso iniziale e nella durata del ciclo tra i due gruppi potrebbe rappresentare un potenziale fattore confondente nell'interpretazione diretta dei risultati produttivi.

## CONCLUSIONI

L'analisi comparativa delle performance produttive e dei parametri economici nei due gruppi evidenzia risultati che richiedono un'interpretazione contestualizzata.

In primo luogo, i costi farmacologici risultano significativamente più elevati nel gruppo vaccinato contro *L. intracellularis*. Tuttavia, tale incremento non appare correlabile alla patologia oggetto di studio, bensì a episodi di morsicature della coda verificatisi durante il ciclo produttivo. Questo fenomeno ha determinato un aumento dei trattamenti terapeutici, incidendo negativamente anche sulla mortalità e sulla percentuale di scarti alla macellazione. Dal punto di vista delle performance alimentari, l'indice di conversione (ICA) risulta favorevole in entrambi i gruppi, confermando un buon livello gestionale aziendale. Tuttavia, il gruppo vaccinato per la *L. intracellularis* ha mostrato un miglioramento rilevante (2,74 vs 2,85 nel gruppo non vaccinato), indicando una maggiore efficienza nell'utilizzo dell'alimento. Analogamente, l'incremento medio ponderale giornaliero (IMPG) è risultato superiore nel gruppo vaccinato (732 g/giorno) rispetto al gruppo controllo (708 g/giorno), con una differenza di 23,7 g/giorno. Tale miglioramento, pur apparentemente contenuto su base giornaliera, assume rilevanza economica quando proiettato sull'intero ciclo di ingrasso.

L'analisi economica complessiva evidenzia un vantaggio pari a +9,15 € per capo a favore del gruppo vaccinato. Tale beneficio risulta tuttavia parzialmente compensato dal maggiore costo farmacologico osservato nel gruppo vaccinato (+6,48 € per capo), attribuibile agli interventi terapeutici correlati agli episodi di morsicature.

Infine, l'analisi della mortalità indica che, escludendo i decessi e gli scarti imputabili al cannibalismo — evento non correlabile all'infezione da *L. intracellularis* — le performance sanitarie dei due gruppi risultano sostanzialmente sovrapponibili. Ciò suggerisce che l'effetto della vaccinazione si esprima principalmente attraverso il miglioramento degli indici produttivi (FCR e accrescimento), piuttosto che mediante una riduzione della mortalità in questo specifico contesto aziendale.

Nel complesso, i risultati indicano che la vaccinazione contro *L. intracellularis* può determinare un vantaggio produttivo ed economico misurabile, sebbene fattori gestionali indipendenti dalla patologia possano influenzare in modo significativo l'esito economico finale. Ulteriori studi condotti su un numero maggiore di cicli produttivi e in differenti condizioni aziendali saranno utili per consolidare tali evidenze.

## BIBLIOGRAFIA

1. Boesen HT, Jensen TK, Moller K, Nielsen LH, Jungersen G. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol.* 2005;109:105–112. doi:10.1016/j.vetmic.2005.05.004.
2. Collins AM, Love RJ. Re-challenge of pigs following recovery from proliferative enteropathy. *Vet Microbiol.* 2007;120:381–386. doi:10.1016/j.vetmic.2006.11.004.
3. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Repeated measures data. In: *Veterinary Epidemiologic Research*. 2nd ed. Charlottetown: VER Inc; 2009. pp. 622–624.
4. Drozd M, Rajashekara G, Kassem II, Gebreyes W. A quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantification of *Lawsonia intracellularis*. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:265–269. doi:10.1177/104063871002200218.
5. Guedes RMC, Gebhart CJ. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol.* 2003;91:135–145. doi:10.1016/S0378-1135(02)00301-2.
6. Hjulsager CK, Grau-Roma L, Sibila M, Enoe C, Larsen L, Segales J. Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. *Vet Microbiol.* 2009;133:172–178. doi:10.1016/j.vetmic.2008.06.014.
7. Jacobson M, Fellström C, Jensen-Waern M. Porcine proliferative enteropathy: an important disease with questions remaining to be solved. *Vet J.* 2010;184:264–268. doi:10.1016/j.tvjl.2009.05.010.
8. Kristensen CS, Baadsgaard NP, Toft N. A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. *Prev Vet Med.* 2011;98:250–258. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.11.015.
9. McOrist S. Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *Vet J.* 2005;170:8–9. doi:10.1016/j.tvjl.2004.04.008.
10. McOrist S, Lawson GH. Porcine proliferative enteropathy. *Vet Rec.* 1993;132:368. doi:10.1136/vr.132.14.368.
11. Nathues H, Holthaus K, Beilage EG. Quantification of *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2009;107:2009–2016. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04389.x.
12. Pedersen KS, Stege H, Nielsen JP. Evaluation of a microwave method for dry matter determination in faecal samples from weaned pigs with or without clinical diarrhoea. *Prev Vet Med.* 2011;100:163–170. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.04.014.
13. Pedersen KS, Toft N. Intra- and inter-observer agreement when using a descriptive classification scale for clinical assessment of faecal consistency in growing pigs. *Prev Vet Med.* 2011;98:288–291. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.11.016.
14. Richter B, Ladinig A, Nedorost N, Weissenböck H. A TaqMan quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of *Lawsonia intracellularis* in fecal and tissue samples from pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:70–73. doi:10.1177/104063871002200112.
15. Segales J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol.* 2005;111:223–229. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.008.
16. Smith SH, McOrist S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res Vet Sci.* 1997;62:6–10. doi:10.1016/S0034-5288(97)90171-5.

17. Ståhl M, Kokotovic B, Hjulsgaard CK, Breum SØ, Angen Ø. The use of quantitative PCR for identification and quantification of *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis* and *Escherichia coli* fimbrial types F4 and F18 in pig feces. *Vet Microbiol.* 2011;151:307–314. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.013.
18. The SPF System. SPF-SuS. Disponibile su: <http://spf-sus.dk/NR/rdonlyres/8BF55D9E-0973-40AB-B209-A818622DDDB3/0/FolderpåengelskSuS.pdf>
19. Wattanaphansak S, Gebhart CJ, Anderson JM, Singer RS. Development of a polymerase chain reaction assay for quantification of *Lawsonia intracellularis*. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:598–602. doi:10.1177/104063871002200416.

**PREMIO  
FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2025**

# QUANTO COSTA LA PED NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO? ANALISI SU DATI DI CAMPO TRAMITE UN ALGORITMO CHE COMBINA UN MODELLO FULL-BUDGET E INFERENZA CAUSALE

PERRUCCI A.<sup>1,2</sup>, DE AVILA H.<sup>3</sup>, LINHARES D.<sup>4</sup>, HOLTkamp D.<sup>4</sup>, SCOLLO A.<sup>1</sup>,  
MAGALHAES E. S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze veterinarie, Università di Torino, Italia

<sup>2</sup>Struttura Srl, Manerbio, BS, Italy

<sup>3</sup>Dip. Scienze animali, Iowa State University, Ames (IA), USA

<sup>4</sup>Dip. Medicina veterinaria diagnostica e animali da produzione, Iowa State University,  
Ames (IA), USA

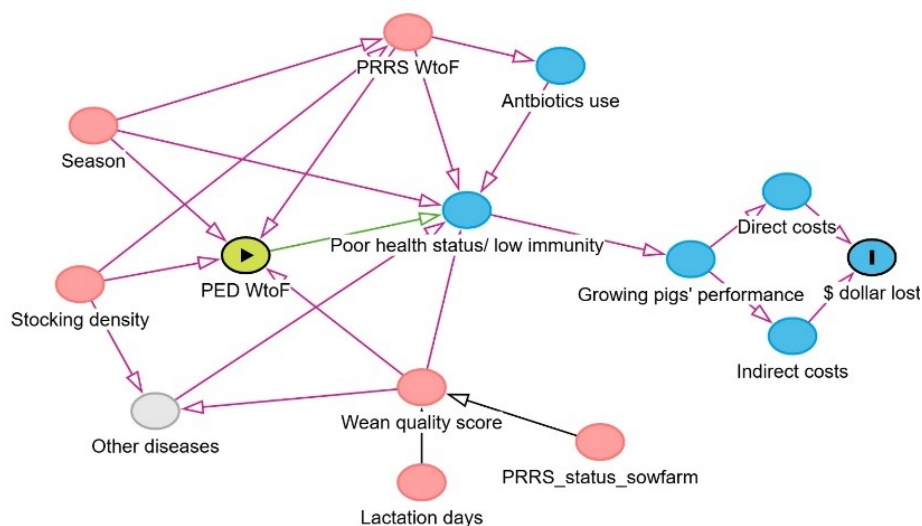
## INTRODUZIONE E OBIETTIVI

Tra le malattie suine, il virus della diarrea epidemica suina (PEDV) rimane una delle principali preoccupazioni nella produzione suina, poiché continua a rappresentare una sfida significativa per l'industria a causa del peso economico associato sia ai costi diretti sia a quelli indiretti. Sebbene gli effetti clinici più devastanti del PEDV siano la diarrea acquosa, il vomito e la disidratazione nei suinetti neonati (Jung et al., 2015), il virus colpisce anche i suini in accrescimento riducendo l'aumento medio giornaliero di peso, compromettendo gli indici di conversione alimentare e ritardando la prontezza al mercato (Alvarez et al., 2015). Sebbene studi abbiano documentato riduzioni prestazionali in suini in accrescimento post-esposizione (Alvarez et al., 2015), le valutazioni economiche a livello aziendale nella fase svezzamento-ingrasso rimangono limitate, spesso basate su modelli statici o aggregati che non controllano per fattori confondenti né catturano fluttuazioni dinamiche in condizioni di campo reali (Thomas and Coleman 2023; Weng et al. 2016). Inoltre, mentre impatti macroeconomici su larga scala sono stati descritti (Schulz et al., 2015), le perdite nette a livello di singola azienda, inclusi costi indiretti come maggiore consumo di mangime e giorni aggiuntivi al macello, risultano sottostimate e scarsamente integrate in analisi dinamiche. Considerando la natura imprenditoriale dell'allevamento suino e il fatto che rappresenta una fonte di sostentamento per gli allevatori e le loro famiglie, è essenziale valutare l'impatto finanziario di malattie infettive come il PEDV in condizioni reali. Questa valutazione supporta decisioni informate per il controllo delle malattie a livello aziendale, riducendo il rischio di bias sistematici derivanti da co-infezioni, variabili gestionali e fattori ambientali. Per catturare accuratamente la dinamica e la complessità dei cicli produttivi negli allevamenti suini su larga scala, sono necessari framework automatizzati basati sui dati di campo, in grado di analizzare grandi quantità di dati in pochi step. Questi framework devono essere dotati di tecniche analitiche avanzate, come approcci di inferenza causale (ad esempio Doubly Robust), che consentono di isolare l'effetto economico netto del PEDV da un più ampio insieme di fattori confondenti (Krieger, 1994). Sebbene l'inferenza causale sia consolidata in epidemiologia umana per ridurre il bias di selezione negli studi osservazionali mediante l'uso del propensity score (Funk et al., 2011), la sua applicazione in valutazioni economiche in zootecnia rimane limitata, nonostante l'urgenza di stime non distorte a livello di sito produttivo. Pertanto, l'obiettivo generale di questo studio era quantificare l'impatto economico del PEDV in condizioni di campo nella fase svezzamento-ingrasso utilizzando un algoritmo che combina un modello economico full-budget con l'analisi di inferenza causale.

## MATERIALI E METODI

Questo è uno studio osservazionale retrospettivo svolto utilizzando dati di campo provenienti da una grande azienda suinicola integrata degli stati Uniti. Sono stati utilizzati dati per un totale di 6068 lotti svezzamento-ingrasso, rappresentanti i suini commercializzati tra gennaio 2023 e settembre 2024. Per ciascun lotto erano presenti dati relativi al sito 1 di origine, alla produzione, inclusi quelli del macello, e di carattere medico-veterinario. L'unità osservazionale è stata definita come un singolo lotto di suini commercializzato da un sito di finissaggio in un determinato momento, potenzialmente proveniente da uno o più allevamenti di scrofe. Dopo il processo di pulizia dei dati, sono stati selezionati 2229 lotti commercializzati tra gennaio 2022 e dicembre 2024, escludendo quelli risultati positivi per qualsiasi malattia diversa dalla PED. Per valutare l'effetto delle epidemie di PED durante la fase svezzamento-ingrasso, sono stati definiti due sottogruppi: uno basato sullo stato PED (positivo vs negativo), desunto dai report veterinari, e un altro basato sulla tempistica dell'epidemia, classificata come "svezzamento" (entro le prime due settimane dall'accasamento in un sito 2) o "alla vendita" (rottura al momento in cui vengono iniziati i carichi dei maiali per la fase di commercializzazione).

Per l'analisi economica, è stato utilizzato come punto di partenza un modello di bilancio completo (modello full-budget) precedentemente sviluppato all'Iowa State University (IA, USA) (Euken & Schulz, 2021), che si trova disponibile in versione Excel. Questo calcolatore economico è costituito da due sezioni. Nella prima sezione ci sono i dati produttivi relativi al lotto di interesse cui due ci sono due scenari a confronto, uno con i dati reali produttivi e un secondo scenario in cui si inserisce un valore di mortalità target, in questo studio del 5%. Nella seconda sezione sono inseriti tutti i costi, diretti e indiretti, suddivisi in costi variabili (mangime consumo, produzione e trasporto, spese medico-veterinarie, manodopera, energia etc.) e fissi (ammortamenti strutturali, commercializzazione, tasse e altri). Il modello restituisce due risultati economici: l'utile netto (\$/capo) e l'opportunità persa (\$/capo). L'opportunità persa è calcolata come la differenza tra l'utile netto dello scenario reale e l'utile netto dello scenario con la mortalità target del 5%, e rappresenta il profitto perso per ciascun lotto dovuto al gap di mortalità reale-target. Questo modello in formato Excel è stato tradotto in un unico algoritmo che permette di eseguire il medesimo calcolo per tutti i lotti in contemporanea. L'impatto economico, espresso come utile netto e opportunità economica persa, è stato analizzato mediante due approcci statistici (Magalhães et al., 2025): modello univariato (UM), che ha regredito la perdita economica per capo sullo stato PED separatamente per rotture in svezzamento e alla vendita, e un approccio chiamato doppiamente robusto (DR) con pesatura inversa della probabilità aumentata (augmented inverse probability weighting, AIPW). L'approccio DR deriva dalla statistica inferenziale (Rosenbaum et al., 1983), ed è chiamato "doppiamente robusto" perché combina un modello multivariato di esposizione al trattamento (rottura da PED), e un modello di outcome, ovvero la perdita economica. Per eseguire l'analisi Doubly Robust (DR), è stato costruito un diagramma causale (Figura 1) che rappresenta graficamente le relazioni tra il fattore di esposizione (infezione da PEDV) e l'outcome economico di interesse. I potenziali fattori di confondimento, identificati mediante tale diagramma causale, hanno incluso: stato della PRRS del sito 1 di origine, stagione di svezzamento, trattamento antibiotico di massa, densità di stabulazione, mortalità pre-svezzamento, durata della lattazione. Tutte le analisi sono state eseguite con SAS® Version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).



**Figura 1.** Diagramma causale per l'impatto dello stato di infezione da PED nella fase svezzamento-ingrasso sulla perdita economica (\$/capo). Il set minimo sufficiente (Minimum Sufficient Set, MSS) di variabili per stimare l'effetto della PED comprende cinque fattori di confondimento: focolai di PRRS nella fase svezzamento-ingrasso, densità di stabulazione, giorni di lattazione, stato PRRS dell'allevamento di scrofe e stagione. Il fattore di esposizione (rottura da PED) è rappresentata dal simbolo verde; l'outcome (perdita economica) è indicato dal simbolo blu con la lettera "I"; i fattori di confondimento sono rappresentati da simboli rosa, in quanto impattano sia sul fattore esposizione sia sul risultato. Le frecce rosa sono le vie causali che indicano invece di confondimento potenzialmente distorsivi, che devono essere bloccati mediante aggiustamento per ottenere una stima non distorta dell'effetto causale totale.

## RISULTATI

Tra tutti i 2229 lotti di suini inclusi nello studio, 48 hanno subito rotture da PED al momento dello svezzamento, mentre 267 hanno presentato rotture in fase di commercializzazione, con 8 lotti colpiti da entrambi i tipi di rottura. Nella tabella 1 sono riportati i risultati relativi ai principali parametri produttivi quali i giorni medi di alimentazione (GMA), il coefficiente di conversione alimentare (FC) il peso medio della carcassa (PMC) e il tasso di mortalità (TM) (Alvarez et al., 2015; Fablet et al., 2018).

Rottura da PED	GMA	FC	PMC (lb)	TM
Svezzamento Si (vs. No)	+ 2.62	+ 0.03	- 5.09	+ 3%
Commercializzazione Si (vs. No)	- 0.19	+ 0.09	- 2.94	- 1%

**Tabella 1.** Differenze nei principali parametri produttivi associati a rotture da PED nella fase svezzamento-ingrasso, confrontate con lotti PED-negativi (Si vs. No). I valori indicano la variazione media stimata per ciascun parametro in presenza di rottura PED rispetto all'assenza di infezione.

Per quanto riguarda i risultati dell'analisi economica in Tabella 2 sono riportati quelli relativi all'utile netto e in Tabella 3 all'opportunità economica persa.

Rottura da PED	Utile netto - UM	Utile netto - DR
Svezamento Si	- 6.96	- 4.60
Svezamento no	- 0.50	- 0.52
Commercializzazione si	- 2.42	-5.58
Commercializzazione no	- 0.19	+ 0.09

**Tabella 2.** Utile netto espresso in \$/capo.

Rottura da PED	Opportunità persa - UM	Opportunità persa - DR
Svezamento Si (Vs. No)	+4.09*	+3.08*
Commercializzazione Si (Vs. No)	-1.73	+2.19*

**Tabella 3.** Opportunità economica persa espressa in \$/capo confrontando i lotti con rottura da PED con quelli de negativi utilizzando entrambi i metodi statistici.

\* se  $p < 0.005$

## DISCUSSIONE

In risposta alla necessità di migliorare la sostenibilità della filiera suinicola, di fronte alla crescente domanda di carne e alle preoccupazioni ambientali, questo studio ha sviluppato una pipeline di modellistica economica specifica per quantificare l'impatto economico di un agente infettivo, riconoscendo il ruolo cruciale della salute animale sulla produttività suina. Tramite algoritmi dedicati implementati per una grande azienda suinicola statunitense, è stata realizzata una pipeline automatizzata in grado di valutare le conseguenze economiche della diarrea epidemica suina (PED) all'interno del sistema produttivo. L'integrazione di flussi di dati eterogenei, relativi a produttività, sanità, diagnostica, consumi di mangime e prezzi di mercato, ha permesso di quantificare con precisione le perdite economiche attribuibili alle mortalità e alle riduzioni prestazionali. L'automazione e l'integrazione di banche dati disgiunte rappresentano un passo significativo verso analisi olistiche e un processo decisionale più informato per gli allevatori.

Oltre all'aumento della mortalità pre-svezamento, la PEDV compromette anche le prestazioni dei suini in accrescimento, determinando ritardi nella crescita e un peggioramento degli indici produttivi, quali l'indice di conversione alimentare (FC), i giorni medi di alimentazione (GMA) e il peso medio della carcassa (PMC), come già riportato in letteratura (Alcaraz et al., 2015) e confermato dai risultati ottenuti. Tale peggioramento di FC e PMC si osserva sia in caso di rotture allo svezzamento sia in fase di commercializzazione.

Per quanto riguarda l'analisi economica, i risultati hanno evidenziato che le rotture di svezzamento generano perdite economiche significativamente maggiori (circa 1 \$ in più per capo) rispetto alle rotture in fase di commercializzazione, sottolineando quanto il momento dell'infezione si impattante dal punto di vista economico. I modelli univariati (UM) risultano concordi con le stime ottenute mediante inferenza causale Doubly Robust (DR) per le rotture di svezzamento; al contrario, in caso di focolai PEDV in fase di commercializzazione, solo l'approccio DR ha permesso di rilevare le fluttuazioni della produttività rispetto al modello

UM (+2,19 \$ vs. -1,73 \$ per capo), grazie al controllo efficace dei fattori confondenti (Magalhaes et al. 2025). Stimare l'impatto economico del PEDV nella fase svezzamento-ingrasso senza controllare per i fattori confondenti (approccio UM) risulta quindi impreciso e soggetto a bias sistematici (Rosenbaum et al., 1983). Poiché l'effetto causale reale del PEDV non è direttamente osservabile, i metodi di stima DR rappresentano l'approccio preferibile in epidemiologia veterinaria: combinando un modello di regressione sull'outcome con un modello di propensity score per l'esposizione, riducono il bias di selezione negli studi osservazionali e forniscono stime non distorte purché almeno uno dei due modelli sia correttamente specificato (Funk et al. 2011; Magalhaes et al. 2025).

L'integrazione di questi framework di dati e metodi di inferenza causale in modelli economici aziendali consente valutazioni più precise dell'impatto delle malattie, applicabili sia a produzioni di piccola che di grande scala. Il modello proposto rappresenta uno strumento robusto per valutazioni precise in condizioni di campo, supportando allevatori e medici veterinari nella formulazione di decisioni più informate e orientate al lungo termine.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez J, Sarradell J, Morrison R, Perez A. (2015) "Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs". *PLoS One*. 10, e0120532.
2. Euken R, Schulz L. (2021) "Assessing economic opportunity of improving mortality rate in wean-to-finish swine production". *Ag Decision Maker*. B1-78. <https://www.extension.iastate.edu/agdm/livestock/html/b1-78.html>. Accessed: March 7, 2026.
3. Jung K, Saif LJ. (2015) "Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis". *Vet J*. 204, 134–143.
4. Krieger N. (1994) "Epidemiology and the web of causation: has anyone seen the spider?". *Soc Sci Med*. 39, 887–903.
5. Funk MJ, Westreich D, Wiesen C, Stürmer T, Brookhart MA, Davidian M. (2011) "Doubly robust estimation of causal effects". *Am J Epidemiol*. 173, 761–767.
6. Magalhães ES, Zhang D, Moura CAA, O'Connor A, Wang C, Holtkamp DJ, Silva GS, Linhares DCL. (2025) "Measuring the impact of sow farm outbreaks with PRRS virus on the downstream mortality using causal inference methods". *Front Vet Sci*. 12, 1545034.
7. Rosenbaum PR, Rubin DB. (1983) "The central role of the propensity score in observational studies for causal effects". *Biometrika*. 70, 41–55.
8. Schulz LL, Tonsor GT. (2015) "Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States". *J Anim Sci*. 93, 5111-5118
9. Thomas P, Coleman K. (2023) "Impactful investments: Measuring return on investment for biosecurity". *Proc AASV*. 2023, 343.
10. Weng L, Weersink A, Poljak Z, de Lange K, von Massow M. (2016) "An economic evaluation of intervention strategies for Porcine Epidemic Diarrhea (PED)". *Prev Vet Med*. 134, 58-68.

A photograph of a pig farm. In the foreground, a large pink flamingo stands in a metal cage. The cage is filled with many small pink piglets. In the background, more piglets are visible in other cages. The scene is lit with warm, golden light, possibly from the setting or rising sun.

**HIPRA**

**Vedi qualcosa di strano  
nel tuo allevamento?**

**PENSA ALLA  
Sindrome Associata  
alla Verotossina (VAS)**

**Riconosci alcuni di questi segnali?**

Crescita subottimale, un consumo elevato  
di antimicrobici

Problemi gravi legati alla streptococcosi  
o necrosi auricolare

**FATTI TROVARE PRONTO  
CON VEPURED®!**

**HIPRA ITALIA**

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



I disturbi gastrointestinali e lo stato di salute dell'apparato intestinale rappresentano i principali fattori critici che incidono sulle performance e sulla sostenibilità degli allevamenti suinicoli.

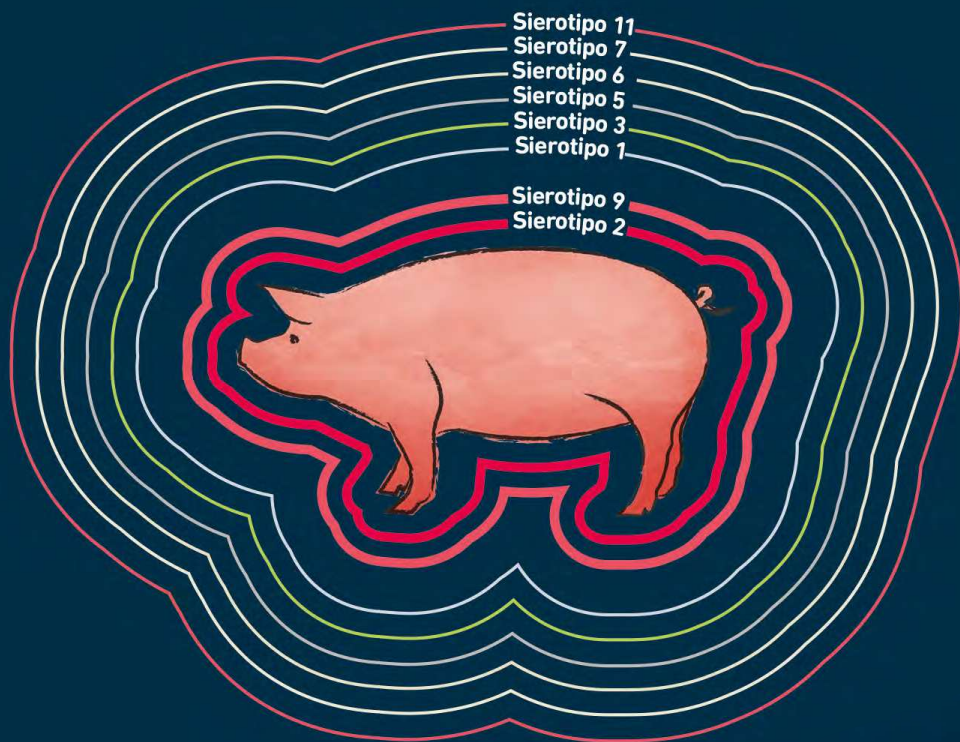
Kemin fornisce un approccio completo per migliorare il benessere intestinale dei suini rafforzandone l'integrità, con un sano equilibrio microbico e sostenendo le funzioni immunitarie. Aiutiamo i nostri partner nel cambiare il modo in cui affrontare la salute intestinale, mediante il nostro programma **Kemin Gut Health Solutions**.

**Per maggiori informazioni:**  
Kemin Italia | 0376 302570  
[kemin.italia@kemin.com](mailto:kemin.italia@kemin.com)

**Scopri di più:**  
[kemin.com/pigs](https://kemin.com/pigs)



**KEMIN**<sup>®</sup>  
Compelled by Curiosity<sup>™</sup>



# SUIVAC APP

NUOVA DEFINIZIONE  
DI PROTEZIONE A 360°

Emulsione iniettabile per suini



#### Specie di destinazione

Suini (suinetti, scrofe e scrofette).

#### Indicazioni

Immunizzazione attiva dei suini a partire da sei settimane di età per la riduzione della mortalità, dei sintomi clinici e delle lesioni polmonari causate dalle infezioni da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sierotipi 2 e 9.

**Natura e composizione del confezionamento primario** Flaconcino da 100 ml (50 dosi)  
**A.I.C. n. 105026025.**

Along with you

[livisto.com](http://livisto.com)

## Proteggi i tuoi maiali per 4 malattie con un'unica vaccinazione

Nuovo **Porcilis® PCV M Hyo ID** - il nostro nuovissimo vaccino combinato RTU da somministrare per via intradermica tramite il dispositivo IDAL®.

Protegge i tuoi animali dal Circovirus suino di tipo 2 (PCV2) e dal *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*).

Miscelabile con Porcilis® Lawsonia ID e utilizzabile in modo concomitante con Porcilis® PRRS.



# Porcilis®



Per approfondimenti visita il nostro Total Pig Health website.

# LA SALUTE DEGLI ANIMALI INIZIA CON L'IGIENE

**MS Schippers**



# LE MINACCE SI ADATTANO...

## CircoMax<sup>®</sup>

DUE GENOTIPI DI PCV2 che proteggono  
verso PCV2a, PCV2b, PCV2d<sup>1</sup>



## CircoMax<sup>®</sup> MYCO

DUE GENOTIPI DI PCV2 che proteggono  
verso PCV2a, PCV2b, PCV2d e *M. hyo*<sup>2</sup>



## SUVAXYN<sup>®</sup>

PRRS MLV

L'UNICO  
VACCINO PRRS  
A PARTIRE DAL  
**PRIMO**  
GIORNO DI VITA<sup>3</sup>

## ... E COSI' DOVREBBE FARE LA TUA PROTEZIONE



RCP CIRCOMAX<sup>®</sup>



RCP CIRCOMAX<sup>®</sup> MYCO



RCP SUVAXYN<sup>®</sup> PRRS MLV

Bibliografia:  
1. CircoMax Summary of Product Characteristic. 2. CircoMax<sup>®</sup> Myco - Summary of Product Characteristics - SmPC, EMA (2020). 3. Suvaxyn PRRS MLV Summary of Product Characteristics.

Zoetis Italia srl Via Andrea Doria 41 M 00192 Roma [www.zoetis.it](http://www.zoetis.it)

zoetis



Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS per il 2026  
si svolgono con il contributo non condizionante di:



ALIVIRA



Boehringer  
Ingelheim

