

Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS nel 2014
si svolgono grazie al contributo di:

BAYER Sanità animale
BOEHRINGER- INGELHEIM
CALIER ITALIA
CEVA Salute Animale
CHEMIFARMA
DOX AL ITALIA
ELANCO ANIMAL HEALTH
ESTEVE VETERINARIA
FATRO
HIPRA ITALIA
HUVEPHARMA
IZO
MERIAL ITALIA
MSD Animal Health
NOVARTIS Animal Health
TRE I
ZOETIS

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI **2014**



ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

XL
MEETING ANNUALE



Centro Fiera del Garda - Montichiari (BS)

27-28 Marzo 2014

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2014

In copertina: Roberto Fontana, "*Maiali*", anno 2012
tecnica mista su cartone telato, cm 70x41

INDICE

Prefazione p. 21

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO UTILIZZO DEGLI ANTIBIOTICI PER VIA ORALE: ESPERIENZE A CONFRONTO

Reggio Emilia, 20 Aprile 2013

Setti A.
Normativa che regola la prescrizione e l'uso dei mangimi medicati p. 27

Caleffi A.
Prescrizione e somministrazione per via orale p. 31

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO EFFICIENZA PRODUTTIVA E BILANCIO ECONOMICO DELL'AZIENDA

Pacengo di Lazise (VR), 11 Ottobre 2013

Salvini F.
E' possibile quantificare il costo delle malattie nell'allevamento suino? p. 39

Carr J.
Risultati di produzione in tempo reale nell'allevamento suino p. 45

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
XL Meeting Annuale, Montichiari (BS), 27-28 Marzo 2014.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2014.

ISBN 978-88-903311-6-9

ATTI DEL XL MEETING ANNUALE

Montichiari (BS), 27-28 Marzo 2014

TAVOLA ROTONDA

LA SCROFA IN SALA PARTO: E' POSSIBILE INTERVENIRE PER MIGLIORARNE LE PERFORMANCES? PARTE I

Yagüe A. P.
Aspetti nutrizionali e gestione dell'alimentazione nelle scrofe in lattazione p. 57

TAVOLA ROTONDA
**LA SCROFA IN SALA PARTO: E' POSSIBILE INTERVENIRE
 PER MIGLIORARNE LE PERFORMANCES? PARTE II**

Drigo M.
 Il controllo della PRRS p. 69

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Scollo A., Catelli E., Casappa P., Amorico A., Mazzoni C.
 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DI UN TRATTAMENTO A
 BASE DI PROGESTINICO E DI PROGESTINICO ASSOCIATO A
 GONADOTROPINE SULLE SCROFETTE PUBERI p. 81

*Pozzi P., Britzi M., Shimshoni J., Edery N., Bouznach A., Cuneah O.,
 Soback S., Bellaiche M., Jounis A., Blech E., Oren P., Perl S.*
 UN EPISODIO DI INTOSSICAZIONE DA IONOFORI (MADURAMI-
 CINA E SALINOMICINA) IN RIPRODUTTORI IN GRAVIDANZA E
 LATTAZIONE p. 89

Rambozzi L., Massaglia S., Merlino V., Borra D., Boschetti G.
 VALUTAZIONE DELL'INFLUENZA DEI FATTORI DI RISCHIO
 LEGATI AL MANAGEMENT E ALLA STRUTTURA AZIENDALE
 SULLA PREVALENZA DELL'ASCARIDIOSI SUINA IN PIEMONTE p. 99

Mazzoni C., Kirkwood R.N., Macchi E., Saleri R., Mongkol T., De Rensis F.
 EFFETTO LUTEOLITICO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN
 AGONISTA DELLE PGF2ALFA IN SCROFETTE PUBERI DURANTE
 DIVERSE FASI DEL CICLO ESTRALE p. 107

Vezzoli F., Benedetti V., Sinelli M., Luini M.
 L'ESAME ISPETTIVO ANTE-MORTEM PER LA VALUTAZIONE
 DEL BENESSERE DELLE SCROFE IN ALLEVAMENTO p. 113

Scalzolaro E., Scollo A., Gottardo F.
 STUDIO DI ARRICCHIMENTI AMBIENTALI PER IL MIGLIORA-
 MENTO DEL BENESSERE IN SUINI IN SVEZZAMENTO p. 121

*Giacomelli M., Drigo M., Pasotto D., Piccirillo A., Menandro ML.,
 Ribaud G., Zagotto G., Montesissa C.*
 STUDIO BASELINE SULLA QUALITÀ MICROBIOLOGICA E
 CHIMICO-FISICA DELL'ACQUA DI ABBEVERATA IN ALLEVA-
 MENTI SUINI IN VENETO p. 133

Salvini F., Guadagnini G., Bresaola M., Mazzoni C., Scollo A.
 DESCRIZIONE DI UN CASO DI VAGINITE INFETTIVA NELLE
 SCROFE p. 143

*Biasi G., Cavallari M., Bonilauri P., Rosamilia A., Maioli G., Gherpelli Y.,
 Dottori M., Luppi A.*
 IMPIEGO DELLA VACCINAZIONE NELLE SCROFE PER IL
 CONTROLLO DELLA MALATTIA DI GLÄSSER p. 147

*Cucco L., Chiancone F.M., Dettori A., Boriosi G., Sebastiani C., Pezzotti G.,
 Magistrali C.F.*
 STUDIO TRASVERSALE SULL'ELIMINAZIONE FECALE DI *B.*
HYODYSENTERIAE IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE ENDEMI-
 CAMENTE INFETTO p. 153

*Forlenza J., Rugna G., Bonilauri P., Carra E., Luppi A., Martelli P.,
 Merialdi G.*
 UTILIZZO DELLA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE (MLST) E
 DELLA SIEROLOGIA PER LO STUDIO DELL'EPIDEMIOLOGIA
 DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* IN UN ALLEVAMENTO
 SUINO MULTISITO p. 161

*Rosamilia A., Carra E., Bonilauri P., Gherpelli Y., Corpus F., Morganti M.,
 Rugna G., Rosignoli C., Nigrelli A., D'Incau M., Biasi G., Dottori M.,
 Merialdi G., Luppi A.*
 PREVALENZA, ANTIBIOTICO-RESISTENZA E CARATTERIZ-
 ZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA*
 SEROVAR 4,[5],12:i:- ISOLATA DA SUINI AL MACELLO E DA
 CAMPIONI PATOLOGICI p. 171

*Ruggeri J., Pesciaroli M., Martinelli N., Gradassi M., Scaglione F.E.,
 Ammendola S., Battistoni A., Magistrali C.F., Pasquali P., Alborali G.L.*
 EFFICACIA DI UN VACCINO ATTENUATO E DI UNO INATTIVATO
 PER LA PROFILASSI DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* NEI SUINI
 IN ACCRESCIMENTO p. 189

De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V.
 EPIDEMIOLOGIA INTERSPECIFICA DI MRSA NELL'AMBITO
 SUINICOLO p. 197

<i>Bilato D., Drigo M., Pasotto D., Amadori M.</i> ANALISI COMPARATIVA DI PARAMETRI IMMUNOLOGICI SIERICI, MUCOSALI E CELLULO-MEDIATI DOPO INFEZIONE DI CAMPO DA VIRUS PRRS (PRRSV)	p. 205
<i>Marro S., Gorla M., Vitale N., Miceli I., Monnier M., Zoppi S., Dondo A., Faccenda M.</i> CONFRONTO TRA DIFFERENTI MATRICI BIOLOGICHE PER LA DIAGNOSI DI PRRS DURANTE UN FOCOLAIO IN SUINI ALL'INGRASSO	p. 211
<i>Guadagnini G., Bresaola M., Paoletti F., Salvini F.</i> ERADICAZIONE DELLA MALATTIA DI AUJESZKY IN TRE ALLE- VAMENTI CON AUTORIMONTA: ESPERIENZE DI CAMPO	p. 219
<i>Scollo A., Contiero B., Casappa P., Avanzini C., Valeria R., Mazzoni C.</i> EFFETTO DEL TRATTAMENTO DI MASSA CON GONADOTRO- PINE NELLA SCROFA A DIFFERENTI INTERVALLI DI TEMPO DALLO SVEZZAMENTO	p. 225
<i>Mazzoni C., Scollo A., Tonon F., Gherpelli M., Bonilauri P., De Rensis F.</i> EFFETTI DELL'IMPIEGO DEL SEME MORTO SULLA FERTILITÀ E SULLA PROLIFICITÀ DELLA SCROFETTA	p. 233

POSTERS

<i>Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A.D.</i> RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI E FATTORI DI VIRULENZA IN CEPPI DI <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLATI DA SUINI SOTTOSCOFA E SVEZZAMENTO	p. 245
<i>Foni E., Arioli E., Bongiovanni E., Bresaola M., Codato A., Donna R., Faccenda M., Fruttero F., Gamba F., Giorgiutti M., Salvini F., Zizioli B., Leotti G., Merdy O., Vila T., Joisel F., Ostanello F.</i> INFLUENZA SUINA: PROFILI SIEROLOGICI IN ANIMALI VACCINATI DI ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA	p. 251
<i>Lasa C., Añón J.A.</i> ESPERIENZA SULL'EFFICACIA DELLA TILVALOSINA PREMIX AI FINI DEL CONTROLLO DELLA DISSENTERIA SUINA IN UN ALLEVAMENTO DA INGRASSO	p. 261

<i>Nigrelli A.D., Rosignoli C., Faccini S., Gamba F., Franzini G., Sarli G.</i> FOCOLAI DI INFEZIONE DA VIRUS DELL'ENCEFALOMIO- CARDITE (EMCV) IN TRE ALLEVAMENTI DA RIPRODUZIONE APPARTENENTI ALLA STESSA AZIENDA DI PRODUZIONE SUINICOLA	p. 269
<i>Sala V., Costa A., De Faveri E., Campiotti G.</i> VALUTAZIONE COMPARATIVA IN CAMPO DI DUE CHINOLONI NEL TRATTAMENTO DELLE BATTERIOSI RESPIRATORIE ACUTE DEL CICLO MAGRONAGGIO-INGRASSO DEL SUINO.....	p. 279
<i>Salvini F., Leotti G., Joisel F.</i> INTRODUZIONE DELLA VACCINAZIONE ANTI PRRSV CON PROGRESSIS® IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO CHE GIÀ VACCINAVA LE SCROFE CONTRO PCV2 CON CIRCOVAC®.....	p. 287
<i>Scollo A., Avanzini C., Contiero B., Mondin P., Mazzoni C.</i> EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN REGOLATORE PROMETABOLICO IN SUINETTI NEONATI	p. 291
<i>Vizcaino E., Rosas ML, Dereu A., Doncecchi P., Piñeiro C., Morales J., Tecli M.E.</i> IL PROGRAMMA DI GESTIONE INDIVIDUAL PIG CARE (IPC) E MIGLIORAMENTO DELLO STATO SANITARIO DI SUINI IN SVEZZAMENTO IN ALLEVAMENTI A BASSO LIVELLO SANITARIO	p. 297

PREMIO GUADAGNINI 2014

<i>Scollo A., Di Martino G., Gottardo F., Contiero B., Bonfanti L.</i> LA MORSICATURA DELLA CODA NEL SUINO: È POSSIBILE EVITARE IL TAGLIO DELLA CODA NEL SUINO PESANTE?.....	p. 303
--	--------



CALIER ITALIA srl - VIA FRAPOLLI 21 - 20133 MILANO
TEL. 02 87 39 20 38 - FAX 02 87 39 20 74
INFO@CALIER.IT - WWW.CALIER.IT

cevolution

Iniettiamo progresso



L'evoluzione dell' antibioticotera



chemifarma® S.p.A.
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Il tuo partner
in terapia veterinaria
e nutrizione animale



Terapia
Veterinaria



Nutrizione
Animale



Linea
Disinfettanti

Distributore esclusivo per l'Italia:



Visita il NUOVO sito web!

www.chemifarma.it



L'azienda italiana che vola nel mondo.



Da sempre conoscenza, applicazione e innovazione rappresentano i segni distintivi di Dox-al e stanno alla base di tutti i suoi brevetti e tecnologie riconosciute a livello internazionale. Forti di questa filosofia vincente, ogni giorno creiamo e sviluppiamo nuovi prodotti, tecnologie e servizi adatti ad ogni singola esigenza produttiva. Una "soluzione su misura" per noi della Dox-al non è un semplice slogan pubblicitario ma, da sempre, lo scopo principale della nostra esistenza... da quarant'anni!



Dox-al Italia S.p.A.

Via Mascogni, 6 - 20884 Sulbiate (MB) Italy - Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400

dox-al

doxal.com

Protezione completa allo svezzamento

PROTEZIONE TEMPESTIVA CONTRO IL *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*



Elanco Animal Health

Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A.
Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)
Tel. 055 4257031 - Fax 055 4257068
www.elanco.it e-mail: Elanco_FA_Italia@elanco.com

Elanco



Innovazione e Ricerca
al servizio della produzione animale

- ☞ Soddisfazioni per i professionisti
- ☞ Benessere per gli animali
- ☞ Rispetto per l'ambiente

ESTEVE S.p.A.
Via Ippolito Rosellini, 12, 1° piano
20124 - Milano (Italia)
Tel.: 02 699.64.224
Fax: 02 699.64.250
e-mail: estevspa@esteve.es
www.veterinariaesteve.com

Prevenzione e Terapia

100%
Made in Italy



Medicinali e Vaccini
studiati, testati e prodotti in Italia

la salute animale per la salute dell'uomo

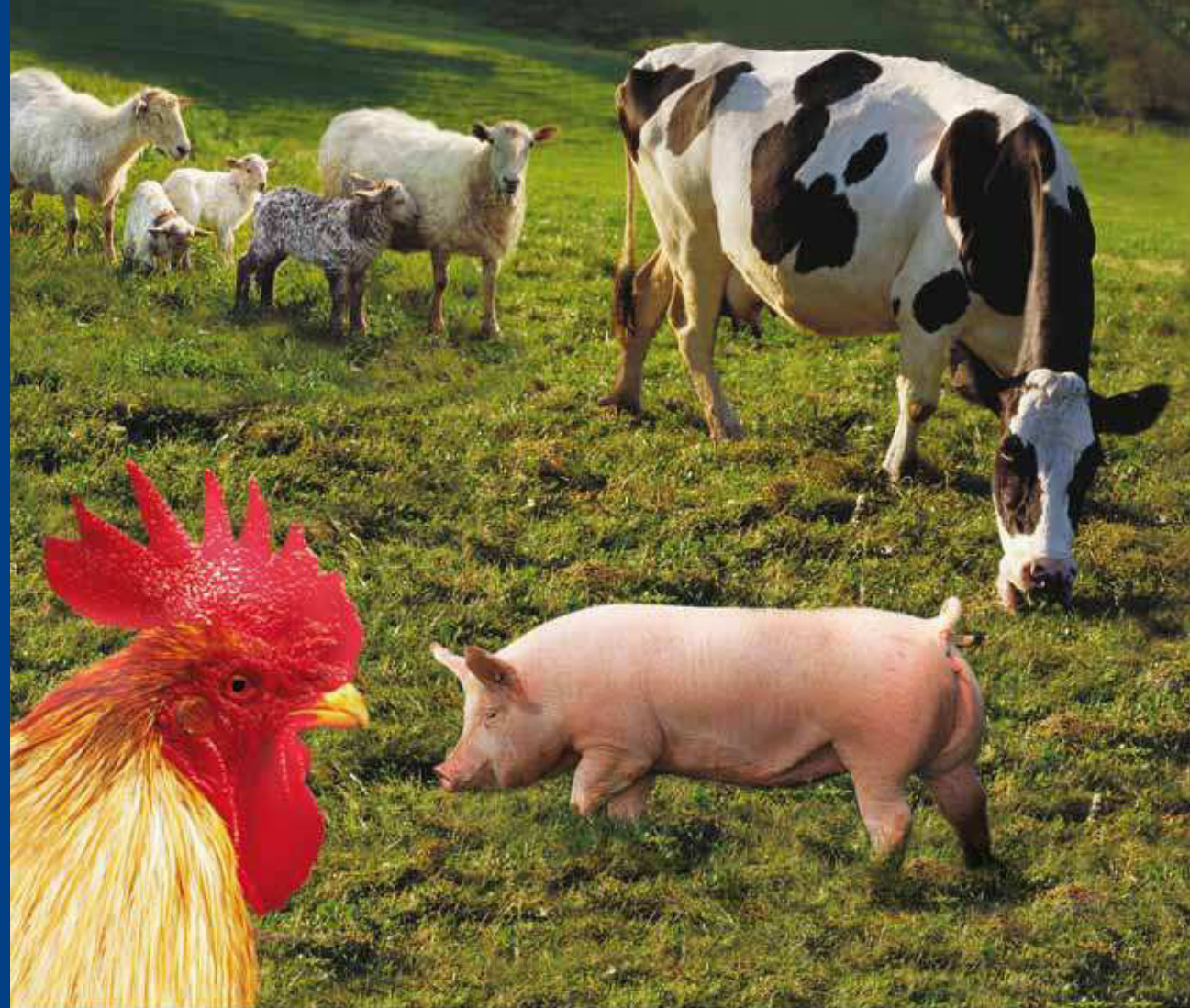
FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano Emilia (BO) - Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512714 - www.fatro.it - e-mail: info@fatro.it





Il Riferimento per
la **Prevenzione** e salute
della tua **Scrofaia**

www.hipra.com



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



www.vetclub.it



PREFAZIONE

La pubblicazione del Volume degli Atti SIPAS è sempre stato vissuto da me, e penso da molti di voi, come un appuntamento per un bilancio dell'attività scientifica svolta nell'anno precedente nel settore della suinicoltura. Siamo giunti alla 40a edizione e questo rappresenta un traguardo importante ed un motivo di orgoglio per una Società che ha accompagnato la vita professionale di molti di noi.

Negli ultimi anni stiamo assistendo a una repentina evoluzione dell'Allevamento, dell'attività del Medico Veterinario e della formazione del Professionista .

La crisi economico-finanziaria che sta interessando tutti i settori produttivi non ha risparmiato il comparto zootecnico e suinicolo in particolare. L'effetto della globalizzazione dei mercati, il contenimento dei costi di produzione e il costante abbassamento dei prezzi stanno sempre più spostando l'attenzione verso le problematiche di filiera nel suo insieme, trascinando con sé la produzione primaria. Nell'ambito della ricerca questa tendenza è particolarmente evidente ed ha portato a una concentrazione delle risorse sulle tematiche di sicurezza alimentare e delle zoonosi a scapito della sanità animale tradizionale.

L'attenzione del Medico Veterinario è sempre stata rivolta alle grandi patologie e all'allevamento suino in funzione della massima produttività dell'allevamento.

Oggi ciò non basta ed è importante che tutto venga contestualizzato in un ambito più ampio che tenga conto degli aspetti gestionali e manageriali, del benessere degli animali, della biosicurezza, della qualità dei prodotti ottenuti e delle conseguenze che gli interventi effettuati possono avere sulla salute pubblica e sulla conservazione dell'ambiente.

Sono convinto che la professionalità del Medico Veterinario sarà sempre più un connubio tra il maggior grado di formazione tecnico-scientifica e la consapevolezza di far parte della categoria.

E' naturale che il tutto si debba svolgere nel pieno rispetto della conoscenza scientifica e della coscienza della professione veterinaria dimostrando apertura culturale nei confronti del nuovo e accoglienza delle esperienze dei colleghi. Questo trasferimento di conoscenze viene richiesto con sempre maggior intensità anche in relazione alla velocità con cui oggi si può accedere alle informazioni attraverso la tecnologia.

In questo momento storico sempre più particolare, la nostra Società rappresenta l'occasione per crescere insieme, un momento di riflessione e uno strumento prezioso di confronto tra operatori del settore. Si può potenziare lo sviluppo della conoscenza attraverso la discussione aperta delle diverse esperienze. La Sipas ha sempre ricoperto un ruolo di interlocutore nel settore suinicolo e ora, che siamo in una fase ricca di informazioni e di canali divulgativi, ancor più. La sua forza sarà saper intuire le esigenze della suinicoltura, rispondere con eventi di aggiornamento scientifico in grado di accrescere la conoscenza delle problematiche di maggior attualità e anticipare la formazione dei colleghi attraverso linee guida per un miglior approccio professionale.

In questo Volume sono contenute le relazioni presentate al Meeting Autunnale e le Pubblicazioni Scientifiche che testimoniano il costante interesse, la maturità e l'esigenza di confronto dei Soci. La presenza di lavori di Ricercatori, ma anche di colleghi che traggono spunto dalla attività quotidiana per segnalare esperienze e proporre risultati, danno ulteriore dimostrazione della vivacità culturale dei Soci.

Inoltre è stato dato spazio al lavoro che ha meritato l'attribuzione del Premio Guadagnini giunto alla sua 15ma edizione. Il Premio rappresenta un appuntamento annuale consolidato a me particolarmente caro considerato l'affetto e la stima che mi hanno legato per anni al Dr. Guadagnini.

Un sincero ringraziamento a tutti voi per avere contribuito e partecipato alle iniziative della Società e ai colleghi del Consiglio Direttivo per la serietà, l'impegno e lo spirito di servizio dimostrato.

Un particolare ringraziamento alle Industrie Salute Animale per la fiducia accordata e per il sostegno finanziario che ha permesso la realizzazione delle iniziative, nonché a tutti i Relatori che con competenza e professionalità hanno partecipato agli Eventi.

A voi cari Soci l'augurio di un interessante Meeting e di una proficua lettura con l'auspicio di una sempre più assidua vostra partecipazione agli Eventi.

Brescia, 27 marzo 2014

Il Presidente
G. Loris Alborali

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**UTILIZZO DEGLI ANTIBIOTICI PER VIA ORALE:
ESPERIENZE A CONFRONTO**

Reggio Emilia, 20 Aprile 2013

LA NORMATIVA CHE REGOLAMENTA LA PRESCRIZIONE E L'USO DEI MANGIMI MEDICATI

ANDREA SETTI

Medico Veterinario, Correggio (RE)

INTRODUZIONE

L'attuale corpus normativo relativo alla prescrizione e l'uso dei mangimi medicati, emanato nel lontano 1993, presenta diverse criticità tuttora sul tappeto. Il presente lavoro analizza le più importanti difficoltà di lettura ed applicative del dettato normativo, esponendo proposte di modifiche e semplificazioni, al fine di superare le criticità suddette.

Normativa vigente

Sono prese in considerazione le principali norme di riferimento, comprese le recenti circolari ministeriali, relative alla prescrizione e l'uso dei mangimi medicati. In particolare per quanto riguarda le circolari, si precisa che non possono spiegare alcun effetto giuridico nei confronti di soggetti estranei all'amministrazione, né acquistare efficacia vincolante per quest'ultima, neppure come mezzo di interpretazione di norme giuridiche, non costituendo fonte di diritti a favore di terzi, né obblighi a carico dell'amministrazione.

Anomalia italiana

La trattazione mette in risalto la problematica relativa al recepimento della direttiva comunitaria in Italia, che ha creato, di fatto, la "anomalia italiana", legata per lo più ad un "errore di traduzione". Nella versione inglese della direttiva 167 del 1990 è riportato "*from authorized medicated pre-mixes only*", che nella direttiva italiana e conseguente decreto legislativo 90/93 è diventato: "*solo con una premiscela medicata autorizzata*", mentre doveva essere: "*solo con premiscele medicate autorizzate*". Ciò ha determinato la conseguenza che tutti i mangimi medicati prodotti estemporaneamente, sono assimilati ai trattamenti in deroga, come da art. 11 del DLgs. 193/2006.

E gli altri ?

Sono analizzate le principali differenze scaturite dal diverso recepimento delle direttive europee sul medicinale veterinario e sulla fabbricazione ed impiego dei mangimi medicati, in alcuni dei paesi europei più importanti ed a noi vicini dal punto di vista zootecnico: Spagna, Regno Unito e Francia.

In tali paesi sia le norme di recepimento sia le linee guida dimostrano un approccio meno rigido rispetto all'Italia. I tre esempi riportati indicano chiaramente come si sia voluto, in questi Paesi, affidare la scelta della terapia, molto più che in Italia, alla professionalità del veterinario.

Prescrizione e registrazioni del veterinario

Sono presi, poi, in esame i principali obblighi ed adempimenti del medico veterinario, a cominciare dalla prescrizione medico veterinaria (ricetta) per i mangimi medicati. Sono, poi, analizzate le registrazioni, annotazioni e dichiarazioni del medico veterinario, relative all'utilizzo dei mangimi medicati in allevamento.

Uso in deroga dei mangimi medicati: falso problema ?

L'uso in deroga dei mangimi medicati comporta una serie di obblighi ed adempimenti da parte del medico veterinario, in applicazione delle principali norme di riferimento. Sono messe in risalto, innanzitutto, le problematiche derivanti dalla lettura del dettato normativo che considera il mangime medicato estemporaneo, contenente cioè più di una premiscela

medicata, alla stregua del trattamento in deroga con medicinale veterinario tout court, generando confusione e comportamenti conseguenti non perfettamente in linea con la norma. Viene, perciò, fornita una chiave di lettura corretta della norma sull'uso in deroga dei mangimi medicati. Viene, poi, puntualizzato che la produzione di tali mangimi medicati estemporanei è possibile solo ed esclusivamente nei mangimifici industriali (art. 16 comma 1 DM del 16/11/1993), escludendo, di fatto, i mangimifici per esclusivo consumo aziendale, che possono produrre, per i propri allevamenti, mangimi medicati contenenti una sola premiscela medicata. Sono, poi, analizzati casi pratici di campo, che riguardano l'uso in deroga, o improprio "consentito", preceduto cioè da una segnalazione di farmacovigilanza, di mangimi medicati negli allevamenti intensivi di maiali. Ogni caso pratico è descritto, mediante un "percorso prescrittivo" chiaro e completo.

Mangimi medicati note ministeriali contraddizioni

Sono analizzate le principali contraddizioni derivanti dalla lettura delle ultime circolari ministeriali, evidenziando la confusione sull'uso in deroga e uso improprio, nonché sull'impiego delle premiscele medicate direttamente nella broda per suini.

CONCLUSIONI

In Europa l'attenzione alla problematica sull'Antibiotico-resistenza è in forte aumento, sia a livello scientifico, sia, a livello istituzionale (parlamento europeo), con la conseguenza che si chiedono maggiori controlli e più consapevolezza nell'impiego degli antibiotici anche in campo animale. Sono, quindi, analizzate le misure messe in campo da alcuni paesi europei (Francia, Danimarca ed Olanda), che "fanno sistema", mettendole a confronto con la risposta italiana, tutta incentrata sull'uso in deroga dei mangimi medicati estemporanei e sulla revisione degli AIC delle premiscele medicate, con l'inserimento di quella dicitura nelle avvertenze dell'impiego: "incompatibilità: da non somministrare con altri medicinali veterinari". Le considerazioni finali richiamano al rispetto delle norme, che devono essere seguite sempre e comunque, anche in caso di note ministeriali che le contraddicano, ponendo l'accento sulla professionalità del medico veterinario prescrittore, che deve, nella prescrizione di mangimi medicati estemporanei, documentare, caso per caso, le scelte terapeutiche praticate.

BIBLIOGRAFIA:

- Setti A. Gatti L., (2011), La Normativa di riferimento del medicinale veterinario, Atti SIVAR 2011: 5-21.
- Setti A. Gatti L., (2011), I trattamenti in deroga, Atti SIVAR 2011: 22-26.
- Tordi M, (2010), Il mangime medicato: un alimento speciale o un veicolo per la somministrazione di medicinali ?, 30 giorni, 3: 23-28.
- Tolasi G, (2010), Panoramica europea sull'uso del farmaco negli allevamenti, 30 giorni, 11: 27-29.
- Casertelli A, (2010), Il ministero ha riscritto il codice del farmaco, , 30 giorni, 12: 13-14
- Reg. 37/2010 UE del 22/12/2009;
- Reg. CE 470/2009 del 6/5/2009;
- DM del 29/2/2008;
- Reg. 1950/2006 CE del 13/12/2006;
- DLgs 193 del 6/4/2006;
- Dir. 2004/28/CE del 31/3/2004;
- Dir. 2001/82/CE del 6/11/2001;
- DLgs 90 del 3/3/1993;
- DM del 16/11/1993;
- DLgs. 158 del 16/3/2006;
- RPV DPR 320/54 del 08/02/1954;
- CIRCOLARE 23 gennaio 1996, n. 1;
- NOTA DGSA Min. Salute n° 7333 – P – 20/03/2010;
- NOTA DGSA Min. Salute n°5727 – P – 29/03/2011;
- NOTA DGSA Min. Salute n°567 – P – 16/01/2012;
- NOTA DGSA Min. Salute n°000017530-P-28/09/2012.

PRESCRIZIONE E SOMMINISTRAZIONE PER VIA ORALE IN ITALIA

REQUIREMENTS AND ORAL ADMINISTRATION IN ITALY

ANTONIO CALEFFI

Gruppo Veterinario Suinicolo Mantovano

Parole chiave: *terapia orale, mangimi medicati, medicazione in acqua*

RIASSUNTO: La terapia per *os* nella specie suina comporta sia dal punto di vista pratico che di quello burocratico una serie di problemi tecnici e di adempimenti normativi che si differenziano a seconda che si tratti di utilizzare l'alimento e in questo caso parleremo di Mangimi Medicati o dell'acqua di bevanda, come veicoli delle molecole terapeutiche.

INTRODUZIONE

In Italia l'utilizzo degli antibiotici sugli animali edibili, a prescindere dalla via di somministrazione è subordinata ad una prescrizione Medico Veterinaria. Le leggi sulla prescrizione degli antibiotici e di quasi tutti i farmaci a somministrazione orale tranne le sostanze ad attività ormonale sono contenute in due leggi, quella relativa ai mangimi medicati è il D.L. n.90 del 03/03/1993, mentre per quelle relative alle specialità o ai farmaci prefabbricati parliamo del D.L. n. 193 del 06/04/2006 e del D.L. n.143 del 24/07/2007. Per quanto riguarda i trattamenti orali parliamo sempre di trattamenti che necessitano di ricetta in triplice copia che tra l'altro prevedono sempre la registrazione del trattamento su appositi registri controfirmati dal veterinario.

MATERIALI E METODI

Mangimi Medicati

La produzione dei Mangimi Medicati (M.M) può essere realizzata esclusivamente in stabilimenti autorizzati, questi potranno essere di tipo industriale, o aziendale per la produzione ad esclusivo autoconsumo. La produzione di questi mangimi deve essere fatta utilizzando per l'integrazione dei principi attivi medicati esclusivamente le premiscele medicate (P.M.) o i prodotti intermedi medicati (P.I.M.). I mangimi ottenuti in questo modo possono essere utilizzati in tutti gli allevamenti senza nessuna autorizzazione o comunicazione preventiva alla autorità sanitaria, per contro in nessun caso è possibile detenere scorte di mangimi medicati. La preparazione di un M.M. contenente più di una P.M. è possibile solo in particolari situazioni, si tratta dei cosiddetti Mangimi Medicati Estemporanei, parliamo di produzioni in "DEROGA" alla legge. La produzione di questi mangimi è riservata esclusivamente agli stabilimenti industriali, e viene descritta in due note ministeriali che sono la NOTA 0005727-P-29/03/2011 (Uso in deroga dei medicinali veterinari) e dalla NOTA 0000567-P-16/01/2012 (Non miscelare con altri medicinali veterinari). La responsabilità della produzione dei mangimi in "DEROGA" resta a carico del veterinario prescrittore.

La produzione dei M.M. a livello industriale rispetto a quelli di produzione aziendale porta alcuni vantaggi ma sicuramente anche alcuni svantaggi. Gli aspetti positivi sono sicuramente quelli legati agli aspetti tecnici come l'esclusivo utilizzo di P.M., la corretta miscelazione delle stesse nel M.M, il rispetto del dosaggio indicato dai foglietti illustrativi della P.M., la produzione sotto il controllo veterinario, un monitoraggio continuo attraverso analisi di laboratorio, la verifica della granulometria del mangime rispetto a quella della P.M.. Per contro la produzione

industriale ha avuto sicuramente almeno negli scorsi anni una grande responsabilità nell'abuso degli antibiotici nei mangimi per motivi commerciali, inoltre tra le note negative sull'utilizzo dei M.M. di produzione industriale troviamo la scarsa tempestività del trattamento legato ai tempi che intercorrono tra la necessità del trattamento e la effettiva disponibilità in azienda del M.M., e la non sempre perfetta corrispondenza tra la patologia da controllare e la molecola utilizzata nel M.M.. Anche per la produzione aziendale dei M.M. esistono pro e contro, tra gli aspetti negativi abbiamo in primis l'utilizzo di prodotti non pensati e registrati per l'uso nel mangime, poi l'utilizzo di impianti di miscelazione che non garantiscono una buona omogeneità del principio attivo all'interno del mangime, un'alta probabilità che si verifichino cross contaminazioni con gli altri mangimi aziendali, inoltre queste produzioni non sono fatte sotto controllo veterinario e con uno scarso controllo di analisi di laboratorio. D'altro canto le produzioni aziendali dei M.M. sono quelle che garantiscono la massima tempestività tra la necessità terapeutica e l'inizio effettivo della terapia, l'utilizzo della molecola più mirata possibile alla patologia presente, e al dosaggio più corretto per la categoria degli animali da trattare, magari con le dovute correzioni legate alla riduzione delle ingestioni dovute alla malattia.

Il calcolo corretto del dosaggio da utilizzare in terapia dovrebbe essere fatto in funzione del peso corporeo e delle effettive capacità di ingestione degli animali da trattare. Dobbiamo infatti ricordarci che la completa efficacia della terapia si ha solo al raggiungimento dei dosaggi in mg. di principio attivo per kg. di peso vivo per un determinato periodo. Al momento del calcolo dobbiamo però tener conto che nei trattamenti orali le ingestioni saranno influenzate dallo stato di malattia, nel caso del mangime avremo una riduzione del consumo alimentare di anche più del 50% del totale della razione, alcuni soggetti saranno in uno stato di completa anoressia.

Per alcuni prodotti, le registrazioni di cui sono dotati, non prevedono una flessibilità nel dosaggio tale da poter realizzare la giusta concentrazione del principio attivo per la categoria di animali da sottoporre al trattamento, ricordiamo a tal proposito che le scrofe hanno ingestioni pari all'1% del loro peso mentre i suinetti arrivano ad ingerire anche sino al 5% del loro peso. In commercio esistono prodotti come specialità o farmaci prefabbricati (P.F.) registrati in modo che possano essere utilizzati in un mangime liquido, questo sistema di medicazione permette una ottima omogeneità del principio attivo nel mangime in quanto l'acqua facilita molto la perfetta miscelazione. Alcuni principi attivi purtroppo hanno cattive caratteristiche di palatabilità al punto che sono in grado di ridurre i livelli di ingestione e di conseguenza di interferire sul raggiungimento dei dosaggi necessari al conseguimento dell'efficacia terapeutica.

Medicazione in acqua

Con il divieto delle associazioni di più premiscele nei M.M. abbiamo assistito ad un grande aumento dell'utilizzo di questa via di somministrazione, che ha indubbi vantaggi rispetto all'utilizzo della terapia attraverso la somministrazione con l'alimento secco.

Tra i vantaggi abbiamo, la disponibilità di quasi tutti i principi attivi quasi come per le terapie parenterali, la possibilità di detenere piccole scorte d'emergenza, inoltre rispetto ai M.M. è un sistema di medicazione di massa fruibile da tutte le aziende senza particolari iter autorizzativi da parte della Autorità Sanitaria. Anche il raggiungimento dei dosaggi terapeutici è facilitato dal fatto che gli animali malati riducono il consumo di acqua in minor proporzione rispetto a quello del mangime, parliamo infatti di un calo del 30% rispetto al normale. Tra l'altro la somministrazione attraverso l'acqua di bevanda permette una elevata velocità di intervento, una flessibile possibilità di cambio di dosaggio e una eventuale sostituzione del tipo di molecola dal momento che si verifichi un insuccesso terapeutico. Ovviamente esistono

anche lati negativi quali un maggior spreco di prodotto e quindi una dispersione dello stesso in ambiente, un calcolo del dosaggio più complesso soprattutto se si devono usare sistemi di dosaggio con soluzioni concentrate, ed ovviamente un costo iniziale per l'impianto e la relativa successiva manutenzione.

Di norma i farmaci solubili o liquidi da utilizzare per questa via di somministrazione hanno un costo più elevato rispetto alle P.M., inoltre dovremo sempre verificare la compatibilità del principio attivo con l'acqua che diventerà l'eccezione del nostro principio attivo.

Per somministrare attraverso l'acqua di bevanda il farmaco, le aziende si devono dotare di impianti che ci permettano di dosare nel modo più preciso possibile i quantitativi di principio attivo che avremo in precedenza calcolato.

Le tipologie di impianto sono fondamentalmente due quelli che prevedono l'utilizzo di pompe dosatrici e quelli con cisterne a caduta. Il sistema oggi più diffuso è sicuramente quello che prevede l'utilizzo delle pompe dosatrici. Anche in questo caso avremo fondamentalmente due tipologie di pompe dosatrici quelle a depressione e quelle a impulsi. Gli impianti con pompe a depressione sono i più diffusi in senso assoluto in quanto sono di facile installazione perché non necessitano di collegamento elettrico, di facile regolazione, con un costo basso di acquisto ed installazione e sono facili da spostare e quindi utilizzabili in più sale. Gli impianti con pompe ad impulso sono molto precisi ma sono decisamente più costosi rispetto a quelli a depressione, e con una maggiore complessità di installazione in quanto per funzionare necessitano di corrente elettrica, anche per quanto riguarda la impostazione sono decisamente più complessi rispetto a quelli a depressione.

Per quanto riguarda l'utilizzo delle cisterne a caduta abbiamo il grosso limite che si tratta di impianti utilizzabili esclusivamente su sale piccole e comunque per un numero ridotto di animali, in quanto in caso di grandi numeri dovremmo avere vasche di enormi dimensioni per poter preparare la soluzione sufficiente al trattamento di tutti i soggetti. Gli impianti a caduta essendo impianti aperti devono prevedere frequenti interventi di pulizia sia delle vasche che delle linee perché soggette a maggior inquinamento da polvere, insetti, formazioni di alghe e inquinamenti batterici.

Parlando in generale della medicazione in acqua possiamo dire che i principali punti critici da conoscere per evitare insuccessi terapeutici sono legati alla conoscenza del consumo reale d'acqua degli animali da trattare, lo spreco dell'acqua, le temperature ambientali, le temperature dell'acqua, il posizionamento, la numerosità e la tipologia degli abbeveratoi disponibili, la portata e la pressione dell'acqua, il peso e la fase del ciclo produttivo degli animali.

ETA'/GIORNI	PESO/KG	CONSUMO/LITRI
28	8	0,8-1,2
35	10	0,9-1,3
42	12,5	1,1-1,5
49	15	1,3-1,7
56	20	1,6-2,0
63	25	2,5-3,0
70	30	3,0-3,6
91	45	3,8-4,4
112	60	4,6-5,5

CONCLUSIONI

Nella specie suina l'utilizzo della terapia per *Os* resta di grande importanza strategica al fine di controllare le malattie batteriche così frequenti e diffuse in tutte le fasi produttive, in particolar modo in quelle di svezzamento e ingrasso risulta essere insostituibile se non altro per il grande numero di animali che ci troviamo a dover trattare contemporaneamente.

Questa pratica inevitabile deve però essere utilizzata con sempre maggiore accortezza al fine di scongiurare insuccessi terapeutici che non solo creeranno un danno economico all'allevatore, e una sofferenza agli animali ma saranno anche probabile causa di insorgenza di quella che viene considerata una emergenza planetaria l'antibioticoresistenza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In una suinicoltura moderna l'analisi dei dati aziendali è strumento indispensabile di lavoro, senza le certezze che vengono dagli elaborati dei programmi di gestione in caso di difetti produttivi corriamo l'elevato rischio di intervenire senza cognizione di causa e quindi senza avere la certezza di intervenire sui punti critici cioè la dove con un giusto correttivo avremmo la massima probabilità di ottenere grandi miglioramenti. Dovremo quindi sfruttare tutte le notizie che il nostro programma è in grado di fornirci e non limitarci ad usare esclusivamente le liste utili solo all'organizzazione del lavoro quotidiano. I programmi di gestione scrofe hanno oramai raggiunto livelli di evoluzione elevatissimi e con ogni probabilità sono oramai maturi i tempi affinché si possano interfacciare i risultati zootecnici con quelli economici, in grado quindi di fornirci informazioni in tempo reale sui costi di produzione. Per chiudere direi che il motto "VINCE CHI SBAGLIA MENO" descrive perfettamente il senso della raccolta dati e della loro interpretazione.

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**EFFICIENZA PRODUTTIVA E
BILANCIO ECONOMICO DELL'AZIENDA**

Pacengo di Lazise (VR), 11 Ottobre 2013

E' POSSIBILE QUANTIFICARE IL COSTO DELLE MALATTIE NELL'ALLEVAMENTO SUINO?

WHAT IS THE ECONOMIC IMPACT OF DISEASES IN PIG FARM?

FRANCESCO SALVINI
PIG VET BRESCIA-ITALIA

Parole chiave: costi, patologie, mortalità, resa alimentare

Key words: costs, pathologies, mortality, food conversion rate

INTRODUZIONE

Quantificare le perdite zootecniche che una patologia può determinare in allevamento, presuppone una raccolta dei dati aziendali fatta in modo preciso, sistematico, metodico e costante, per poi creare un dato storico che ci permetta di valutare in modo oggettivo ogni variazione rispetto allo standard di allevamento. Per il 57% degli allevatori statunitensi, una malattia spesso subclinica, come l'Ileite Proliferativa, può causare perdite economiche anche sostenute, e questo perché i suini colpiti sono spesso non valorizzati al macello come gli animali sani, determinando una riduzione del prezzo di vendita. Per questo è fondamentale che la percezione di una perdita e la valutazione del dato zootecnico, sia rilevata ed osservata in modo preciso ed oggettivo.

E' risaputo che circa l'85% del costo di produzione del suino grasso, è determinato da costi diretti, influenzabili anche in modo significativo dalla capacità dell'allevatore, e solo il 15% dei costi invece sono di tipo indiretto. Le percentuali cambiano invece nelle scrofe.

Se facciamo riferimento ai primi 6 mesi del 2013, il costo di una scrofa in azienda, è stato di circa 900 euro/anno, pari a 2,5 euro al giorno, ed il 54% di questo costo era rappresentato da mangime, farmaci e costi di fecondazione; la restante parte del costo è rappresentate da costi indiretti, che non variano in caso di mancata produzione degli animali. E' evidente quindi che nel calcolo del possibile guadagno, il peso della produttività aziendale è molto importante.

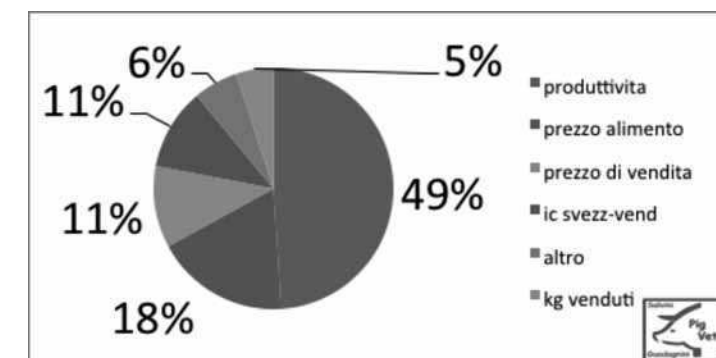


Fig. 1 Il peso dei criteri nel calcolo del guadagno (synagri.com,2011)

Tab. 1 Parameters' weights in the count of the gain

Ecco quindi che la perdita o il guadagno nella scrofaia, dipende in gran parte dalla produttività aziendale, mentre nelle fasi di accrescimento ed ingrasso il peso maggiore nella redditività è rappresentato dalla resa alimentare, dal controllo dell'uso dei farmaci, dalla mortalità, dalla ottimizzazione della mano d'opera e da una corretta esposizione finanziaria. Ci sono molti altri fattori in grado di ridurre il costo di produzione, e sono stati riassunti molto bene nel sito "suidaemp" nel 2010; le 10 regole sono:

- AVERE AZIENDA SANE
- Avere un attento e costante controllo dei consumi alimentari
- Ridurre le dosi di seme utilizzato in allevamento
- Valutare molto attentamente il consumo in farmaci (il parto NON è una malattia!!!)
- Sfruttare al massimo le strutture dell'allevamento
- Aumentare l'efficienza della mandria al fine di avere più kg con meno animali
- Eliminare le scrofe vecchie e lavorare per ridurre il numero di scrofe eliminate entro il 3° parto
- Ridurre lo spreco di combustibile e di energia
- Formare i dipendenti circa i nostri obiettivi
- Avere un sistema di confronto dei dati economici e produttivi con altre aziende

Avere aziende sane è sicuramente la voce più importante per garantire una redditività dell'allevamento, anche se nella valutazione di una patologia, spesso la componente psicologica ha un fortissimo impatto sull'allevatore, tanto che una malattia acuta, che determina forti perdite in un tempo limitato, è considerata economicamente più importante, rispetto a patologie croniche, che determinano perdite minori ma per un tempo più lungo. Non a caso le patologie più studiate da un punto di vista economico, sono la Polmonite enzootica e la Ileite proliferativa. Valutare economicamente fenomeni acuti, è invece forse più facile, ma sicuramente meno standardizzabile.

Abbiamo quindi provato a calcolare il costo di alcune patologie, nei diversi settori dell'allevamento, cercando di considerare non solo gli aspetti relativi alla mortalità o alla resa alimentare, ma anche considerando il mancato guadagno o l'aumento dei costi fissi che la malattia provoca.

I COSTI DI UN EVENTO ACUTO DI PRRS

Un evento acuto riferito a PRRS nelle scrofe in un sito 1 di 1500 riproduttori, che ha provocato 120 aborti a termine in un periodo di 40 giorni, è stato responsabile di una perdita economica molto sostenuta, come evidenziato nella tabella sottostante

> dei giorni improduttivi	30.900 euro
Mancata produzione di suinetti svezzati	42.000 euro
> dei costi fissi all'ingrasso	24.624 euro
< occupazione delle sale parto	12.000 euro

Fig 2: Analisi dei costi diretti ed indiretti in un focolaio di PRRS in un sito 1
Tab 2: analysis of the direct and indirect costs in a PRRS out break

Per l'allevatore un evento acuto di questo tipo, è devastante da un punto di vista psicologico, e la quantificazione del danno economico è spesso facilmente calcolabile. Spesso però la breve durata dell'evento, fa sì che si dimentichi facilmente il danno subito, senza valutare attentamente i necessari cambiamenti di natura manageriale, che sono invece alla base di una buona stabilità sanitaria dell'azienda. La risposta più frequente si limita invece a trovare delle soluzioni estemporanee, di natura farmacologica o vaccinale, che spesso non esitano nel risultato desiderato.

Come evidenziato in fig 2 invece, una buona gestione è in grado di ridurre significativamente i costi aziendali. E' inoltre facile notare come ci sia una proporzione inversa fra spesa in farmaci e produttività.

AZIENDA	A	B	C	D	E	F
N° SCROFE	485	850	1210	652	792	1470
SPESA/ANNO PER SCROFA	31	72	51	92	71	103
N°SVEZZATI/SCROFA/ANNO	29,2	28,9	25,6	23,5	22,7	22,2

Fig. 3 Spesa in farmaci e produttività in un sito 1 (dati 2007)
Tab. 3 drugs' costs and productivity

I COSTI DELLE PATOLOGIE NELLA FASE DI INGRASSO

Nelle fasi di accrescimento ed ingrasso, la perdita economica che una patologia può provocare, è determinata da moltissimi fattori: tipo di allevamento, gravità della malattia, numero di animali presenti, misure di biosicurezza adottate, management. E non sempre una forma acuta provoca maggior perdite rispetto ad una cronica, come evidenziato in fig. 4

MALATTIA	Fase acuta		Fase cronica	
	FC	Ritardo a 90kg	FC	Ritardo a 90kg
Pleuropolmonite	0,1-0,4	7-30	0,1-0,3	4-15
Rinite Atrofica	0,1-0,2	4-15	0,1-0,2	4-15
Polmonite enzootica	0,1-0,4	10-21	0,05-0,1	3-21
Malattia respiratoria cronica	0,1-0,4	7-30	0,1-0,3	7-28

Fig.4 Perdite economiche e malattia (M.R. Murihead, T. Alexander, 1997)
Tab.4 zootechnical losses and diseases

Per la Polmonite enzootica, esiste una tabella, elaborata da Straw nel 1989, in base alla quale viene stimato un danno economico in base alla percentuale di polmone colpito da Mycoplasma Hyopneumoniae. Se i dati rilevati al macello e valutati secondo lo schema Madec, vengono incrociati, è abbastanza facile calcolare il danno economico che la Polmonite Enzootica può dare.

In realtà tutti i dati economici vengono calcolati su suini di 110kg, ed è abbastanza difficile trasportare il dato nella realtà dell'allevamento italiano. Non è noto se e quanto la lesione può ridursi dai 110 ai 170kg, ma in base ad uno studio di Dottori et al, 2007, si può ipotizzare che la % di tessuto polmonare colpito possa ridursi di 2,5-3 volte.

ALS %	ADWG gr	EURO PIG	EXTRA DAYS	0,1 euro DAY	0,24euro KG/FEED
5	-26	0,4	4	0,4	0,9
10	-52	3,1	9	0,9	2,9
15	-75	5	14	1,4	4,8
20	-105	6,9	20	2	6,5
25	-131	8,8	26	2,6	8,3
30	-157	10,5	33	3,3	9,6

Fig. 5 Rapporto fra il danno polmonare rilevato alla macellazione e le performances zootecniche (Straw et al, 1989)

Tab. 5 relation between lung's damage at slaughter house and zootechnical performances

Conoscendo i costi diretti ed indiretti di un suino allevato in Italia, è possibile valutare con buona approssimazione, l'incidenza economica che questa malattia può determinare nei nostri allevamenti. Per esempio, con i costi del primo semestre 2013, una lesione del 5% del tessuto polmonare, può provocare una perdita economica di circa 6,5 euro per capo, che aumenta a quasi 14 euro se la lesione arriva al 10%.

Abbiamo provato a calcolare le perdite economiche che la malattia può dare, andando a valutare diversi score polmonari effettuati al macello secondo lo schema Madec. In fig 6 sono evidenziate le perdite, divise per suini colpiti e suini caricati.

AZIENDA	N° POLMONI VALUTATI	SCORE POLMONARE SECONDO MADEC	N° POLMONI CON LESIONI	% MEDIA LESIONI PER POLMONE	PERDITA ECONOMICA PER SUINO COLPITO (euro)	PERDITA ECONOMICA PER SUINO CARICATO (euro)
1	100	0,6	28	3,19	4,2	1,17
2	100	0,7	26	4,59	6,13	1,59
3	100	0,79	44	2,95	3,94	1,73
4	100	1,03	29	6,05	8,08	2,34
5	100	2,3	61	6,8	9,08	5,53
6	100	3,15	53	12,9	18	9,54
7	100	3,27	73	9,1	12,7	9,27
8	100	4,01	71	11,64	16,24	11,53

Fig. 6 Rapporto fra score polmonare, polmone colpito e perdita economica

Tab. 6 relation between lung's score, damaged lung and economic loss

Nonostante le elevatissime perdite economiche che una malattia come la Polmonite Enzootica può provare, molto frequentemente l'allevatore non considera e non valuta patologie croniche, ma si preoccupa molto di più di forme acute che causano mortalità. In realtà i suini morti, anche se psicologicamente hanno un impatto molto alto sull'allevatore, non sempre determinano perdite economiche importanti. Basti pensare che una lesione polmonare del 5% causata da Mycoplasma, incide economicamente quanto un incremento di mortalità del 4%.

PARAMETRO (per grasso caricato)	VALORE	PERDITA ECONOMICA
MORTALITA'	+1% (da 35 a 165kg)	0,8,2,6 euro
ICA	+0,1	4 euro
RESA	-1%	5,3 euro
IMG	-1%	2 euro
COSTO SCROFA/GIORNO	2,5 euro	

Fig. 7 Incidenza economica di diversi parametri zootecnici (primi 6 mesi 2013)

Tab. 7 economical impact of different zootechnical parameters (first 6 months of 2013)

In considerazione alle elevate perdite economiche che la Polmonite Enzootica è in grado di provocare, non è del tutto fuori luogo parlare di eradicazione della malattia, tenuto ovviamente conto della situazione territoriale in cui è ubicato l'allevamento. Ma se la condizione di negatività può essere mantenuta, molti autori considerano economicamente vantaggioso eradicare il Mycoplasma. Una eradicazione con parziale de popolamento, si ripaga secondo Szancer (2008) in 12 mesi, mentre un programma di totale depopolamento può dare benefici dopo 36 mesi (Dunlop, 2010).

Un'altra patologia che interessa frequentemente le nostre aziende e che è sicuramente causa di grandissime perdite economiche, è l'Enterite Necrotica da Brachispira Hyodysenteriae. Dati di bibliografia e dati raccolti in aziende seguite da noi, dimostrano che la mortalità può aumentare in talune situazioni, dal 2% al 4% e che il costo dei farmaci utilizzati per il controllo della malattia può passare da 2 a 4 euro capo, in aziende con problemi cronici di Enterite Necrotica.

Un'analisi zoeconomica dei danni subiti in un allevamento colpito, ha evidenziato come la resa alimentare possa aumentare di 2,5 punti percentuali, passando dal 28,5 al 26%, e che la mortalità aumenta di 2 punti percentuali. A questo calo di performances zootecniche, va aggiunto un aumento dei costi in farmaci, pari a 2,55 euro/capo. La perdita complessiva per capo venduto, poteva arrivare a circa 18 euro per suino.

Anche per questa patologia ed alla luce della notevole perdita economica che può provocare, un programma di eradicazione, basato sull'uso mirato di farmaci e su un controllo rigoroso dei flussi e delle misure di biosicurezza, può essere economicamente molto vantaggioso.

BIBLIOGRAFIA:

Dottori, M et al (2007) Valutazioni comparative delle risultanze di scoring polmonari al macello tra differenti pesi di macellazione. (100.160kg). Atti della Società di Patologia ed Allevamento dei suini

Madec F. e Derrien, H, (1981) Frequence, intensité et localisation des lesion pulmonaires chez le porc charcutier: resultants d'une premiere serie d'observations en abattoir. Journee de la recherche porcine en France.

Straw BE et all. (1990) Examination of swine slaughter. Part 1 et Part 2

MR Muirhead Eradication of swine dysentery from closed pig herds, Veterinary Record 1981;108:26 567doi:10.1136/vr.108.26.567

Szancer, J. Incontro GVS (2008)

RISULTATI DI PRODUZIONE IN TEMPO REALE NELL'ALLEVAMENTO SUINO

JOHN CARR

www.carrsconsulting.com

Quali sono i dati veramente importanti in un allevamento di suini?

I dati di un allevamento possono essere raggruppati in tre principali categorie: dati ambientali, di produzioni e finanziari.

Dati finanziari

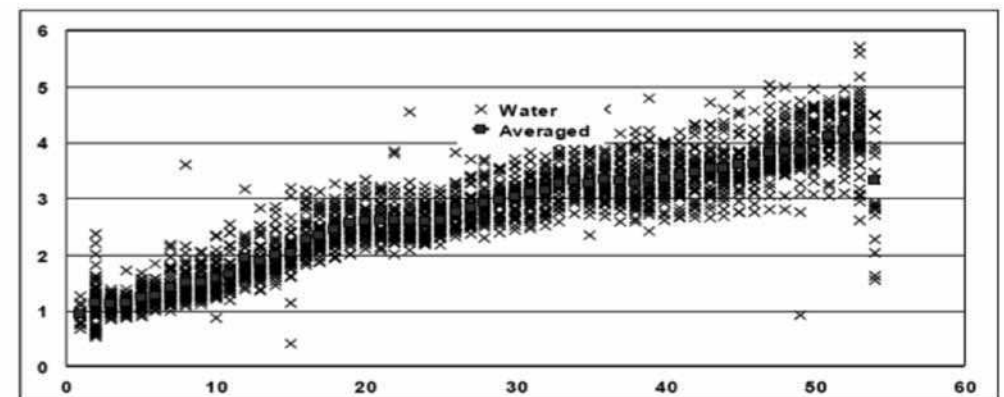
Gli allevatori e i loro commercialisti raccolgono e monitorano i dati finanziari dell'allevamento. L'allevamento, come tutte le aziende, ha come scopo principale quello di generare un profitto, di conseguenza il dato di profitto deve essere il primo a comparire su un report di revisione, insieme ai dati sul controllo dei costi.

Tutte le consulenze all'allevatore, che riguardo la produzione di suini, dovrebbero almeno portare ad una riduzione dei costi di produzione e/o ad un aumento dei kg di carne di suino venduti. Chi fornisce consulenza dovrebbe tenere conto di questi due aspetti, perché se la consulenza non porta ad almeno uno dei due risultati, allora non ha avuto alcuna utilità. Ad esempio se si consiglia all'allevatore di diminuire i giorni fino alla macellazione, ma senza ridurre i costi di produzione, tale modifica non avrà nessun impatto sulla resa in carne e quindi, nessuna influenza sul profitto dell'azienda.

Dati ambientali

Ad oggi, sono disponibili moltissimi strumenti per il monitoraggio ambientale, che possono essere utilizzati per registrare le esatte condizioni alle quali i suini si trovano in allevamento. I dati monitorabili sono molteplici e ci permettono di migliorare la gestione dell'allevamento. Ad esempio si può valutare il consumo di acqua in azienda. L'utilizzo di acqua è, infatti, un indicatore dell'assunzione di cibo e quindi dei tassi di crescita, e fornisce dati in tempo reale sulle performance produttive.

Fig. 1 Utilizzo di acqua in svezzamento (Bird and Crabtree 2013).



Il grafico (Fig. 1) rappresenta il consumo medio di acqua per suino per giorno post-svezzamento, dal giorno 28. Il grafico mostra chiaramente che i suini bevono progressivamente di più all'aumentare della crescita. La correlazione è più evidente quando l'utilizzo di acqua

viene rappresentato graficamente in rapporto al consumo di cibo e alla crescita: l'assunzione di cibo è la ragione principale del consumo di acqua.

Dati di produzione

Nonostante i dati elencati in precedenza siano importanti, questo articolo si concentrerà maggiormente sui dati che riguardano la produzione.

Gli allevatori, solitamente, si paragonano tra loro utilizzando caratteristiche come, ad esempio, il numero di suini prodotti per scrofa per anno, il tasso di parto o la mortalità pre-svezzamento. Ma questi numeri sono davvero importanti?

Esempio 1. *Mortalità pre-svezzamento.* Una bassa mortalità pre-svezzamento è sempre un indice positivo? Si consideri, ad esempio, che la mortalità pre-svezzamento sia bassa, circa dell'8%, ma il numero medio di suinetti svezzati sia 10. Questa non è una situazione positiva per l'allevamento. Come può l'allevamento arrivare a 12 suinetti svezzati in media? L'allevamento avrebbe un margine di miglioramento se avesse ad esempio una mortalità pre-svezzamento del 12%, ma un numero di suini svezzati pari a 11.5.

Esempio 2. *Tasso di parto.* La portata al parto è un dato interessante? In un allevamento di 250 scrofe gestite a bande settimanali - con 10 scrofe che partoriscono a settimana, il tasso di parto può variare dall'84% al 91%. Questo dato però, può non avere nessuna influenza sul fatto che almeno 12 scrofe devono essere fecondate per ogni banda per far sì che ci siano almeno 10 scrofe che partoriscono per ogni banda. Il risultato di una settimana è pertanto, insignificante, in quanto il dato dovrebbe essere acquisito su 52 settimane in un anno.

Esempio 3. *Numero di suinetti per scrofa.* Raggiungere una produzione di 35 suinetti per scrofa per anno può portare ad una riduzione del gruppo di scrofette e a una gestione non corretta delle scrofe riformate - nel tentativo di ridurre i gruppi di scrofe più vecchie. Quando il risultato di questa gestione si traduce in gabbie parto vuote, locali svezzamento vuoti e di spazi vuoti lungo la catena di macellazione, allora, di certo, i costi di produzione saranno aumentati e il profitto diminuito.

Come si può capire quali sono i problemi di un allevamento?

I sistemi di registrazione dati sono perfetti per registrare singole situazioni o eventi, ma non offrono un grande aiuto per la gestione dell'allevamento in tempo reale, dato che non tengono conto di quella che è la pianificazione aziendale.

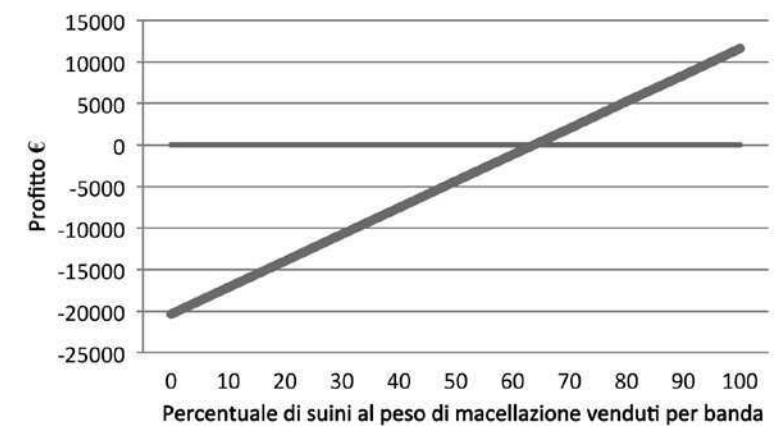
Quindi quali informazioni sono utili per capire quali sono i reali problemi di un allevamento? In tabella 1 sono schematizzati i dati più significativi in relazione ad ogni settore dell'allevamento.

Tab. 1 Dato più significativo per settore dell'allevamento

	Cos'è importante?
Per l'allevamento	Costo di produzione per una banda
Per le unità di parto	Svezzati per banda
Per le sale parto	Per ogni banda tutte le gabbie parto sono occupate
Per le unità di ingrasso	Kg venduti per banda Kg di mangime utilizzati per banda

La maggiore implicazione a livello di costi è l'effetto marginale suino- l'importanza di vendere fino all'ultimo kg di carne per ogni banda.

Fig. 2 Profitto generato per banda

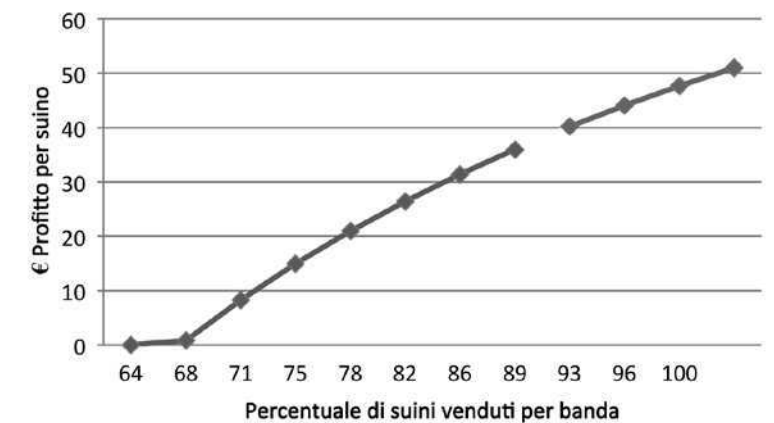


Nel grafico (Fig. 2) il punto di incontro tra la linea blu (profitto) e la linea rossa rappresenta il momento in cui vengono recuperati tutti i costi. Assumendo un costo di produzione di 1,5€ e un guadagno di 1,8€ per kg di peso vivo (suino di 170kg di peso vivo) di suino alla vendita.

Questo grafico indica che si ha un profitto solo dopo che il 62% dei suini è stato venduto. Non tutti i suini hanno quindi lo stesso potenziale di profitto.

Il seguente grafico (fig. 3) è stato ottenuto esaminando l'impatto che ha una gabbia parto vuota sul profitto.

Fig. 3 effetto di una gabbia parto vuota



Nel grafico (Fig. 3) la linea blu indica il guadagno, quella rossa gli introiti generati dalla vendita di suini dall'ultima banda.

Se vengono svezzati molti più suini per gabbia parto per banda, l'impatto della presenza di gabbie parte vuote sulle performance di allevamento aumenta.

Programmazione del sistema a bande dell'allevamento

Definire il numero di bande che un allevamento può sopportare.

Pianificare il lavoro in allevamento

Applicare in allevamento quanto previsto nella pianificazione

Come iniziare?

Reparto ingrasso.

Il reparto ingrasso potrebbe essere il miglior posto da cui partire. La densità di stabulazione imposta dalla dec. 2008/120/EC suggerisce che:

📖 suini con un peso vivo superiore a 85 Kg e inferiore a 110Kg necessitano di una superficie libera al suolo di 0.65m² per suino;

📖 quando i suini superano i 110 kg tale superficie è di 1.0 m² per suino.

Spesso gli allevamenti aumentano di dimensioni nel tempo, e questo fa sì che esistano più edifici con caratteristiche diverse e spazi disponibili differenti. Per questo motivo è importante come viene organizzata l'unità di ingrasso. I reparti di ingrasso hanno spesso anche spazio libero (corridoi di passaggio ecc.), che può essere utilizzato se necessario. Inoltre ci sono gli effetti stagionali: nei mesi estivi più caldi l'assunzione di cibo e la crescita diminuiscono, quindi sarà necessario più spazio per la zona ingrasso. Per avere suini a pieno peso di macellazione nella stagione invernale, l'allevamento dovrebbe avere una zona ingrasso vuota.

Unità parto.

I locali adibiti al parto delle scrofe possono essere costituiti da varie sale e da strutture che rendono difficile l'applicazione del tutto pieno-tutto vuoto o lo fanno risultare difficile all'allevatore. Ciononostante, il numero di scrofe che partorisce per ogni banda non cambia nelle diverse stagioni, l'unità parto rappresenta quindi un perfetto punto di partenza per la programmazione delle bande.

Avere ben chiara la capacità dell'unità parto dell'allevamento, permette di gestirla correttamente e organizzare diverse aree di pieno-vuoto. Ad oggi molti allevamenti vengono considerati in termini di numero di scrofe nell'unità parto.

Tab. 2 Nella tabella seguente, le diverse tipologie di gestione a bande hanno lo stesso risultato in numero di gabbie parto per banda.

Confronto tra allevamenti	scrofe vs organizzazione in bande					
i campi gialli possono essere modificati	tutti questi allevamenti avranno 44 gabbie parto per banda					
dimensione dell'allevamento (numero scrofe)	1000	o:	44	gabbie parto/banda per banda equivalente		
distanza tra bande	5	4	3	2	1	settimane
scrofe nell'unità parto	200	250	333	500	1000	scrofe

Una volta che l'unità parto dell'allevamento è stata strutturata in maniera corretta, l'organizzazione del resto segue facilmente (il determinante è la distanza temporale tra due bande consecutive).

Tab.3 Flusso di produzione per banda

Flusso di produzione per banda						
i campi gialli possono essere modificati						
scrofette		fecondazioni		parti		ingrassi
9	€	54	€	44	€	528
Area parto	220	scrofe		Spazio per banda	156	513 m ² per banda
Area fecondazioni	324	femmine		Gruppi necessari	6	20 gruppi
Area gestazione	440	scrofe		Spazio totale necessario	936	10260 m ² totali
Tot. scrofe e scrofette	1065	femmine				
Ipotesi						
Portata al parto	82	%	Distanza tra bande	1	settimana	
Svezziati per gabbia	12	suini	Età allo svezzamento	4	settimane	
Tasso di svezzamento	98	%	Età post-svezzamento	10	settimane	
Tasso di suini portati a fine ingrasso	97	%	Età di macellazione/vendita di tutti i suini	30	settimane	
Superficie al suolo nei locali svezzamento	0,3	m ²	N.B. Può essere aggiunto il tempo per il tutto vuoto			
Superficie al suolo nei locali ingrasso	1	m ²				

100% degli obiettivi raggiunti

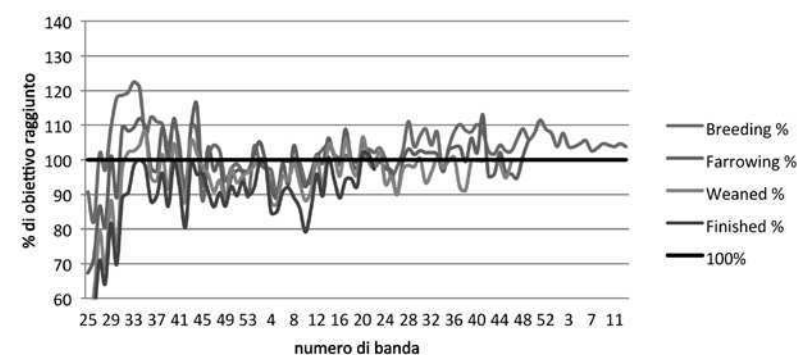
Una volta completata la pianificazione dell'azienda, i risultati possono essere facilmente monitorati in tempo reale di banda in banda.

Acquisizione dei dati

I dati vengono acquisiti per ognuno dei parametri che riguarda una banda e vengono poi confrontati con i parametri target.

Esempio. Un allevamento ha adottato per due anni un modello di flusso produttivo e progressivamente ha rimosso le variazioni all'interno dei risultati, banda dopo banda (Fig. 4).

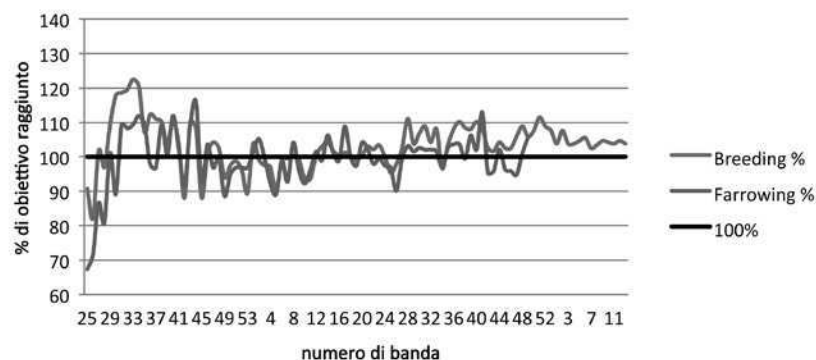
Fig. 4 Percentuale di obiettivi di produzione raggiunta in relazione al numero di banda



In questo allevamento, inizialmente, la variazione rispetto al target è del 40%, ma una volta che il modello è stato migliorato, la variazione diventa del 4% e tutti gli obiettivi vengono raggiunti.

Il valore di questa valutazione sta nel fatto che i dati sono indipendenti da dimensioni dell'allevamento ecc., mentre dipendono da 'quanto bene' l'allevamento riesca a raggiungere gli obiettivi che si è posto nella pianificazione aziendale. Questi parametri possono essere inoltre confrontati tra loro in tempo reale (Fig. 5).

Fig. 5 Percentuale degli obiettivi di fecondazione (blu) e parto (rossa) raggiunta per numero di banda. Confronto tra fecondazione-parto.



Se la linea di fecondazione è al di sopra di quella del parto – il tasso di parto supera il target che deve raggiungere; se la linea di fecondazione è al di sotto di quella di parto, allora il tasso di parto è minore da quello prefissato. Questo tipo di confronto può essere utilizzato per valutare la situazione reale in allevamento.

Fig.6 Confronto tra fecondazione (rossa)-svezzamento (verde).

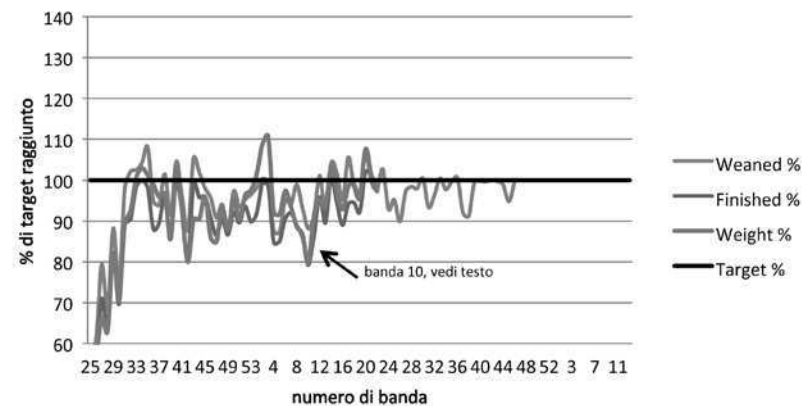
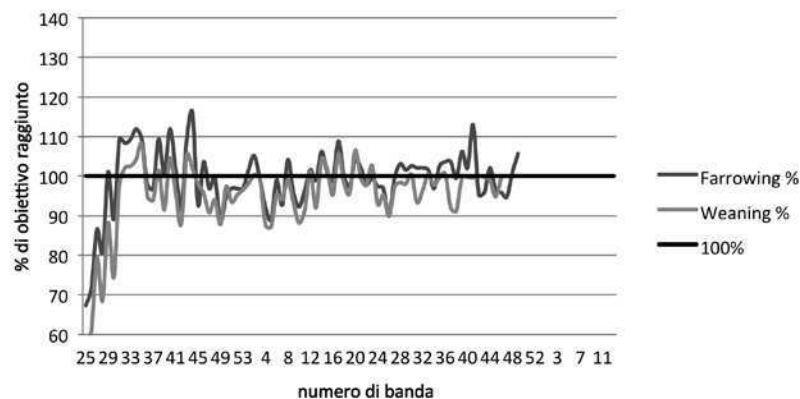
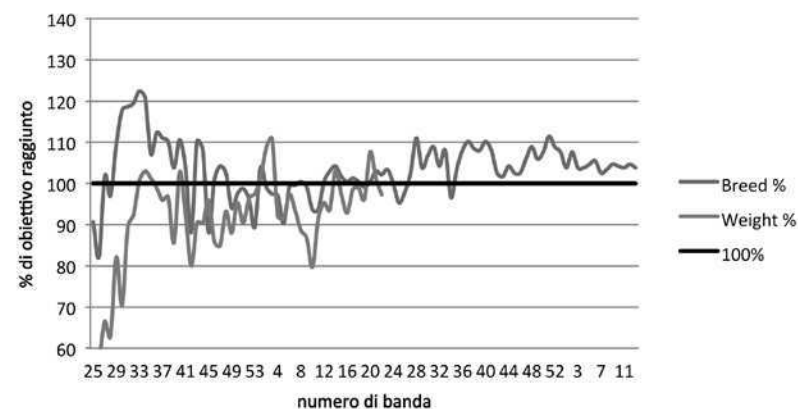


Fig. 7 Confronto tra % svezzati- % ingrassi-peso

L'improvviso calo nella banda 10 (freccia) è stata causata, secondo il team sanitario, ad un focolaio di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), ma probabilmente anche l'iniziale fallimento dell'obiettivo fecondazione ha fatto la sua parte. L'allevamento nella banda 10 non ha raggiunto il target di fecondazione di 15 scrofe, quindi non ha raggiunto il target di parto, di conseguenza non ha raggiunto il numero di 230 suinetti in svezzamento (target: 10.5 svezzati per gabbia parto per banda), che in associazione al focolaio di APP ha impedito di raggiungere il target di 397 ingrassi. Del fallimento della banda 10 il team sanitario ha incolpato il focolaio di APP, ma in verità, questo ha avuto un peso pari solo al 55% nel non raggiungimento del target di ingrasso. Non fecondare un numero sufficiente di scrofe fa sì che venga a mancare il numero di suini in ingrasso corrispondenti, cosa che è stata completamente dimenticata dal team sanitario dell'allevamento. Forse, se ci fosse stato un numero sufficiente di suini nell'edificio, il focolaio non si sarebbe verificato!

In generale comunque, questi grafici dimostrano chiaramente quanto tutti i comparti di un allevamento siano interdipendenti tra loro. Ad esempio lo sono i due punti più distanti: la fecondazione e il peso di macellazione (Fig. 8).

Fig. 8 Confronto tra fecondazione e peso alla macellazione



Il grafico dimostra come ogni fattore, fecondazione, parto, suinetti svezzati, numero di suini in ingrasso, peso alla macellazione siano evidentemente correlati tra loro.

In tabella 5 sono riassunti i dati statistici riguardanti questo allevamento durante il periodo analizzato.

Tab. 5 Dati statistici dell'allevamento analizzato.

	media	SD	varianza
fecondazione	103	6.9	48
parto	99	8.0	64
svezzamento	95	8.9	80
ingrasso	89	10.3	106
peso	92	11.8	139

Si presti attenzione allo scarto temporale nei risultati: il parto è 17 settimane dopo la fecondazione, lo svezzamento 4 settimane dopo il parto e l'ingrasso 26 settimane dopo il parto.

Come possono essere raggiunti questi risultati

Tabella delle fecondazioni

Le fecondazioni sono un'importante componente dell'organizzazione del flusso produttivo aziendale. La tabella delle fecondazioni dovrebbe essere posizionata in evidenza, in una posizione visibile per tutto il team aziendale. I dati riportati possono comprendere anche svezzamento e ingrasso, in modo tale che tutta la produzione sia visualizzabile. Inoltre la tabella dovrebbe essere utilizzata e discussa, durante le visite in allevamento (Tab. 6).

Tab. 6 Tabella della produzione aziendale

Service week	S R G	Week of gestation														Farrowing house weeks					Service week	W			
		12 (13)		Heat check weeks 3-6				11 (Cull week)								Order new gilts weeks 10 to 14									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	1	2	3	4	5		
1	10+1-1	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	10	10	22	12	125
2	9+1-2	12	12	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	23	12	118
3	10+1-1	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	10	10	24	12	122
4	8+0-2	10	10	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	25	10	104
5	9+1-2	12	12	12	11	11	11	11	11	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	26		110
6	8+0-4	12	12	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		27		
7	10+1-2	13+	13	13	12	12	11	11	11	11	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10			28		
8	9+1-2	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10				29		
9	10+2-1	13	13	13	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11					30		
10	9+2+1	12	12	11	10	10	10	10	10	10	9	8	8	8	8	8	8						31		
11	10+1-2	13	13	12	11	11	11	11	11	11	11	10	11	11	11	11							32		
12	10+1-1	12	12	12	12	12	10	10	10	10	10	9	9	9	9								33		
13	10+2+2	14+	14	14	13	12	11	10	10	10	10	10	10	10									34		
14	10+1-1	12	12	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10										35		
15	9+1-2	12	12	11	10	10	10	10	10	10	10	10											36		
16	8+1-3	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11												37		
17	9+1-1	12	12	12	11	11	11	11	11	11													38		
18	8+0-4	12	12	10	9	9	9	9	9														39		
19	10+1-1	12	12	11	11	11	11	11	11														40		
20	10+1-1	12	12	11	10	10	10																41		
21	10+0+2	12	12	10	10																		42		
22	10+1-1	12	12	11	11																		43		
23	9+2+1	12	12	10																			44		
24	9+1-2	12	12																				45		
25	10+0+2	12																					46		
26																							47		
27																							48		



Gestione della riforma delle scrofe

La chiave per raggiungere un'efficiente gestione del flusso di suini è la gestione delle scrofe. Per poter riformare le scrofe, è necessario fecondare un numero adeguato di scrofe, quindi si dovrebbe aspettare a riformare le scrofe fino a quando la gravidanza non sia confermata - circa 35 giorni post-svezzamento.

Sovra-fecondazione

Per potere raggiungere la produzione richiesta, i target di fecondazione dovrebbero essere settati ad un valore minimo. Gli allevamenti dovrebbero fecondare più scrofe di quelle previste, di circa un 10%, se il target di fecondazione è di meno di 50 scrofe, altrimenti di un 5%. La riforma viene effettuata solo su scrofe gravide, in eccesso rispetto al target.

Il vantaggio della sovra-fecondazione è che l'aumento dei costi delle scrofe viene facilmente ripagato svezzando 2-3 suinetti. Il vantaggio di avere più suinetti svezzati rispetto al target fa sì che alle scrofe siano assegnati 12 o più suinetti e che i suinetti deboli (meno di 80 g alla nascita) e con deformità congenite possano essere sottoposti ad eutanasia. Utilizzando la sovra-fecondazione è più semplice raggiungere il target previsto del numero minimo di suinetti svezzati. Inoltre, le scrofe in più possono essere utilizzate come balie o essere utili nel raggiungimento dei target di fecondazione.

Conclusioni

Gli allevamenti devono rimuovere le variazioni nel sistema produttivo per essere efficienti nella produzione. Il mantenimento di un adeguato stato sanitario inizia dall'applicazione del tutto pieno-tutto vuoto che impone però alla azienda di avere una pianificazione adeguata. Una volta che la pianificazione aziendale è stata fatta, il team dell'allevamento deve applicarla in azienda.

ATTI DEL XL MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA

**LA SCROFA IN SALA PARTO:
E' POSSIBILE INTERVENIRE PER MIGLIORARNE
LE PERFORMANCES? PARTE I**

Montichiari (BS), 27-28 Marzo 2014

ASPETTI NUTRIZIONALI E GESTIONE DELL'ALIMENTAZIONE NELLE SCROFE IN LATTAZIONE

DR. ANTONIO PALOMO YAGÜE

Director División Porcino
SETNA NUTRICIÓN S.A.U. – InVivo NSA
antoniopalomo@setna.com

INTRODUZIONE

Quando ci riferiamo al conseguimento della migliore performance del nostro gruppo di riproduttori dobbiamo tener conto che le linee genetiche moderne sono l'evoluzione di quelle di alcune decine di anni fa, derivate da miglioramenti genetici costanti. Per questo motivo dobbiamo mantenere un comportamento dinamico per adattare a queste stesse linee genetiche i progressi fatti nel campo delle strutture, della nutrizione, del controllo ambientale e della gestione.

Le scrofe moderne, incluse in questo momento anche quelle del ramo iberico, sono state selezionate per un miglioramento della prolificità. Tra quelle dal mantello bianco, alle quali farò particolare riferimento in questo articolo, abbiamo scrofe iperprolifiche con 12-14 suinetti nati per parto, più magre e più pesanti alla pubertà, con, in aggiunta, un minor appetito rispetto alle loro antenate.

Inoltre, queste scrofe hanno una maggiore produzione di latte e, per tanto, dobbiamo assicurare loro una maggiore ingestione di nutrienti.

Cosicché, oggi, i nostri obiettivi a livello produttivo nella scrofa sono focalizzati su due punti fondamentali:

- a) Svezzare il maggior numero di kg di peso complessivo della nidiata per scrofa per anno, della migliore qualità ed omogeneità (75-80 Kg di nidiata per scrofa, pressappoco 200 kg per scrofa/anno). Secondo questi parametri un obiettivo futuro è quello di svezzare un peso complessivo di suinetti pari al peso della scrofa al momento dell'inseminazione
- b) Mantenere una buona condizione corporea durante tutta la vita produttiva, in special modo prestando attenzione ad evitare una eccessiva perdita di peso (grasso e muscolo) durante la lattazione. Una buona condizione corporea, infatti, è direttamente correlata con fertilità, produttività e longevità della scrofa.

Di conseguenza, negli attuali programmi di miglioramento genetico si pone particolare enfasi nella pressione di selezione per l'indice di sopravvivenza dei suinetti e per la capacità di ingestione della scrofa.

Per la qual cosa, in questo lavoro tratterò tre aspetti fondamentali all'interno della nutrizione della scrofa finalizzati ad ottimizzare la produttività e la longevità della stessa. Questi tre capisaldi sono:

- 1- Elevata produzione di latte
- 2- Condizione corporea stabile
- 3- Massimizzare il consumo di alimento in lattazione. Vista la sua grande importanza stupisce che fino ad oggi solamente l'1% delle pubblicazioni in suiatra riguardi l'alimentazione della scrofa.

PRODUZIONE DI LATTE

Conoscere la produzione di latte delle nostre scrofe è fondamentale per stabilire le necessità nutrizionali in lattazione che si basano sulle esigenze per il mantenimento della scrofa in aggiunta a quelle per la produzione di latte.

Il peso del suinetto allo svezzamento è direttamente influenzato da: peso alla nascita, età allo svezzamento, dimensione della nidiata, assunzione di colostro e consumo di mangime sottoscrofa, ma soprattutto dalla quantità e qualità della produzione di latte da parte della scrofa durante tutta la lattazione.

Le stime sulla produzione di latte giornaliera nelle scrofe possono essere calcolate mediante la seguente equazione di Noblet & Etienne:

$$MS \text{ (gr/nidiata/giorno)} = 0,72 \times GMD - 7 \times \text{numero di suinetti}$$

In questo modo, se abbiamo una nidiata di 10 suinetti svezzati a 21 giorni di vita con una crescita media per suinetto di 250 g, la produzione giornaliera di latte in base al consumo di sostanza secca è di 1793 grammi/giorno. Avendo il latte circa il 18% di sostanza secca, possiamo stimare una produzione di latte giornaliera di 10 litri che equivale a dire che ogni 4kg di latte facciamo 1kg di peso del suinetto. In termini energetici questo comporta che:

1- Il latte contiene tra 1290 e 1330 kcal/kg di energia metabolizzabile

2- Ogni Kg di peso del suinetto accumulato in lattazione richiede 5400 kcal EM. Le necessità energetiche di mantenimento sono di 105 kcal EM per kg di peso metabolico.

Il coefficiente marginale di efficienza energetica nella produzione latte è del 70%, dato che il 60% dell'energia di ogni kg di mangime extra viene direttamente dedicato alla sintesi di latte. Così ogni kg di mangime extra giornaliero si ripercuote in un incremento potenziale di 275g di aumento di peso giornaliero per la nidiata. Questo, in lattazioni di 21 giorni con nidiata di 10 suinetti, comporterebbe svezzare soggetti con 577g di peso in più o 5,77 kg di peso complessivo della nidiata, ovvero il peso di un suinetto in più.

La composizione nutrizionale media del latte di scrofa in termini percentuali è:

- Sostanza secca 18-19
- Proteina grezza 5,0-5,5
 - Lisina 7,39 g/100gr PB
 - Metionina 2,00 g/100 gr PB
 - Treonina 4,34 g/100 gr PB.
- Grasso grezzo 7 - 8
- Lattosio 5
- Ceneri 1 (Dourmad et al , 1991).

All'interno dei nutrienti del latte, alcuni sono difficilmente modulabili per via nutrizionale, come nel caso della proteina, dove i livelli di amminoacidi apparentemente non hanno subito variazioni negli ultimi 20 anni. Il cambiamento dei livelli di amminoacidi e proteine nella dieta modifica lievemente i medesimi livelli nel latte, ancorchè sia noto che una maggior assunzione di lisina possiede una correlazione lineare con il peso del suinetto e della nidiata allo svezzamento a causa di una maggiore produzione di latte.

Così, il massimo accrescimento giornaliero di una nidiata si ottiene con una assunzione di lisina totale giornaliera di 70 g (Allee,G. - 2007).

In altri studi precedenti i suddetti fabbisogni sono di 67,6 g di lisina al giorno (Aherne et al , 1998).

Le necessità medie stimate di lisina nelle scrofe riproduttrici le possiamo riassumere in :

a- Fabbisogni di mantenimento: 2 g al giorno o 36 mg per kg di peso metabolico.

b- Fabbisogni di produzione: 26 g per kg di incremento di peso dei suinetti.

Per tanto i livelli di lisina totali nella dieta di scrofe con una nidiata di 10 suinetti e un consumo medio di mangime di 6 kg per scrofa/giorno durante i 21 giorni di lattazione, devono mantenersi tra 1,0-1,1 % della dieta.

Dobbiamo considerare a questo punto che il peso vivo della scrofa influisce molto lievemente sulle necessità giornaliere di lisina, essendo più determinante la sua ingestione per l'accrescimento giornaliero dei suinetti.

Nella seguente tabella possiamo visualizzare la stima dei fabbisogni di lisina ed energia nelle scrofe in lattazione (Hyteck R&D Barn , 2008):

PARTO SCROFA	1° Parto	2° Parto e Seguenti
Peso scrofa (Kg)	214	273
Incremento di peso della nidiata (kg/giorno)	2,25	2,40
Consumo di mangime per scrofa/giorno(kg)	5,15	5,90
Fabbisogni energetici - EM		
* Mantenimento	5.875	7.050
* Produzione	15.750	16.800
* Totale	21.625	23.850
Fabbisogni di lisina totale (gr/giorno)		
* Mantenimento	2,0	2,0
* Produzione	58,5	62,4
* Totale	60,5	64,4

Il livello e la composizione degli acidi grassi presenti nel latte dipendono dall'apporto energetico della dieta della scrofa. All'aumentare dei livelli di grasso nella dieta, aumentano i livelli di grasso nel latte e non necessariamente si ha un incremento della produzione latte. È necessario considerare i maggiori fabbisogni energetici delle scrofe primipare rispetto alle multipare a causa delle loro necessità per l'accrescimento. Pertanto l'impatto sul contenuto di grasso nel latte, dovuto alla supplemento di grasso nel mangime, potremo notarlo maggiormente nelle scrofe multipare rispetto alle primipare.

Allo stesso tempo, quando somministriamo una sufficiente quantità di mangime le scrofe sono in grado di attingere alle loro riserve di grasso aumentando il contenuto di grasso e sostanza secca del latte.

Nella seguente tabella ho riassunto le necessità di lisina nelle scrofe in lattazione in relazione al consumo di mangime giornaliero e al peso della nidiata (Bussieres, D - 2008):

INCREMENTO PESO NIDIATA (KG/DIE)	LISINA TOTALE INGERITA (GR/DIE)	5,00 KG	5,50 KG	6,00 KG	6,50 KG
2,20	59,2	1,18	1,08	0,99	0,91
2,30	61,8	1,24	1,12	1,03	0,95
2,40	64,4	1,24	1,17	1,07	0,99
2,50	67,0	1,34	1,22	1,12	1,03
2,60	69,6	1,34	1,27	1,16	1,07
2,70	72,2	1,44	1,31	1,20	1,11
2,80	74,8	1,50	1,36	1,25	1,15

CONDIZIONE CORPOREA STABILE NELLE SCROFE

Oggi giorno il nostro lavoro come nutrizionisti comporta la responsabilità non solo di bilanciare adeguatamente le differenti razioni delle scrofe riproduttrici, ma dobbiamo anche essere capaci di applicare i programmi di razionamento correttamente a ogni fase produttiva e per ogni scrofa individualmente.

In tal modo massimizzeremo il peso della nidiata allo svezzamento, e minimizzeremo la perdita di condizione corporea della scrofa (nella scrofa iberica dobbiamo prefiggerci una perdita minima di peso durante la lattazione e, nelle scrofe di genetica europea un massimo di perdita di condizione corporea al fine di ottimizzare i parametri riproduttivi post-svezzamento)

L'obiettivo è quello di disporre di una dieta eccellente che ci permetta di raggiungere il consumo adeguato di nutrienti (modellizzazione). A livello pratico si ottengono migliori risultati quando conseguiamo buoni consumi di mangime con diete standard, rispetto ad avere razioni esuberanti con consumi deficitari. Di conseguenza la gestione dei mangimi e pertanto la sua applicazione pratica, mediante un adeguato addestramento del personale delle sale parto, è di importanza predominante senza però dimenticare della qualità del mangime stesso.

Rispettivamente la eccessiva perdita di condizione corporea nelle scrofe di genetica europea e l'insufficiente perdita di condizione corporea nelle scrofe iberiche, mette a repentaglio la loro vita produttiva, peggiorando l'intervallo svezzamento-estro, la fertilità e la prolificità nei successivi cicli produttivi (Young, 2004).

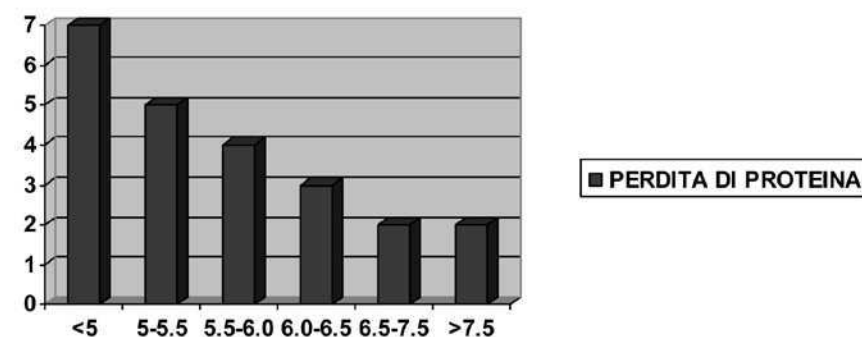
Una perdita di proteina superiore al 9-10%, equivalente ad una perdita di peso media in lattazione superiore al 20%, determina un peggiore sviluppo follicolare, riducendo la dimensione della nidiata al parto successivo

(Clowes et al , 2003).

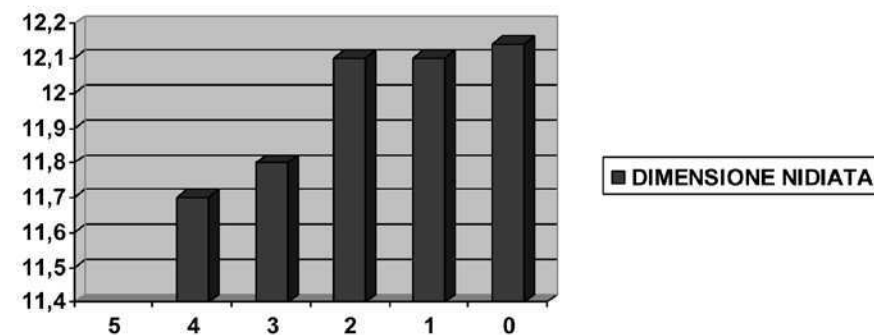
Una delle equazioni che ci permettono di calcolare il contenuto proteico delle nostre scrofe di genetica europea è quella di Dourmad (1997), che si presenta nella seguente forma:

$$\text{Massa proteica} = 2,28 + (0,178 \times \text{peso vivo}) - (0,333 \times \text{grasso in mm})$$

Di seguito riporto un grafico dove possiamo notare la relazione tra consumo di mangime in lattazione e la perdita di proteina corporea della scrofa (Hytek R&D, 2008):



In modo parallelo nel seguente grafico possiamo osservare la relazione tra la perdita di grasso in lattazione e la dimensione della prossima nidiata alla nascita (Allee,G , 2007):



MASSIMIZZARE IL CONSUMO DI MANGIME IN LATTAZIONE

La strategia nutrizionale durante la fase di lattazione si basa sul tentativo di far mangiare la scrofa il più possibile, evitando eccessive perdite di peso.

Nella scrofa iberica questo obiettivo si inverte, a causa della sua tendenza all'ingrassamento dovuta all'applicazione di una alimentazione razionata come durante tutta la gestazione.

Il bilancio energetico e degli aminoacidi è negativo in lattazione, specialmente durante la prima settimana. Così le esigenze nutrizionali sono molto elevate, ma si sovrappongono ad una bassa ingestione, ancor più nelle scrofe iperprolifiche.

La condizione corporea della scrofa al parto influisce sostanzialmente sul consumo di mangimi in lattazione. Una scrofa grassa al parto, infatti, avrà una capacità limitata di consumo volontario di mangime in lattazione oltre a poter incorrere in problematiche metaboliche nel periparto.

È bene ricordare che l'appetito è controllato dal sistema nervoso centrale.

Un eccessivo consumo energetico tra i 50 e gli 80 giorni di gestazione determina una maggiore infiltrazione di grasso a livello del tessuto mammario.

Ciò oltre a ripercuotersi negativamente sul consumo di mangime nella lattazione successiva, penalizza anche la produzione di latte nella scrofa.

Inoltre, come in tutti i casi di eccessivo consumo di mangime, dal punto di vista economico accumuliamo due perdite: la prima per una peggiore conversione di mangime per chilo di peso dei suinetti svezzati (superare i 50 kg di mangime), la seconda dovuta ai problemi produttivi conseguenti ad una produzione di latte inferiore ed un minor peso della nidiata allo svezzamento

(inferiore ai 50 kg).

Questo è quello che comunemente conosciamo come effetto 50/50.

Un'altro fattore critico che influenza il consumo di mangime in lattazione è l'ordine di parto poichè le primipare hanno un minor consumo volontario, che a livello pratico si stima essere un 12-20 % inferiore rispetto a quello delle multipare.

Questo punto è importate al momento della definizione di un piano di razionamento individuale comprendendo la possibilità di applicare sistemi di alimentazione differenziata tra scrofe di primo parto e le restanti.

Ci sono altri punti fondamentali da tener presenti al fine di ottimizzare il consumo di alimento in lattazione:

- 1- Condizioni ambientali nella sala parto: il range di temperatura di comfort per la scrofa è 18-22°C. Ogni due gradi al di sopra di questo intervallo il consumo di alimento decresce di 150 g.
- 2- Somministrazione di acqua in quantità e qualità adeguate: i fabbisogni sono di 10 litri per ogni 100 kg di peso vivo, con una portata di 1,5-2 litri/minuto nei cucci.
- 3- Presentazione dell'alimento: il consumo è maggiore in diete liquide con una adeguata diluizione (3-4/1). È possibile incrementare un 12-15 % il consumo di sostanza secca per scrofa in questo tipo di diete rispetto all'alimentazione a secco.
- 4- Tipo di mangiatoia e accesso all'alimento: l'accesso deve essere il più facile possibile considerando che la scrofa si alimenta con un angolo di 45°. Le mangiatoie devono avere un disegno che permetta di evitare sia lo spreco di cibo sia un eccessivo avanzo.
- 5- Frequenza dei pasti: per raggiungere la maggiore ingestione possibile sono auspicabili tra 3 e 4 somministrazioni giornaliere a seconda del sistema di alimentazione, del personale, degli orari, etc.
- 6- Qualità del mangime: soprattutto basato sulla digeribilità di amminoacidi ed energia, apporto vitaminico minerale, appetibilità e assenza di contaminazioni da micotossine ed ossidazioni
- 7- Curva di alimentazione non troppo restrittiva durante la prima settimana, né troppo forzata soprattutto nelle primipare. La curva deve essere adeguata al peso ed alla condizione corporea della scrofa all'ingresso in sala parto.

Di seguito in forma grafica verranno illustrati alcuni riferimenti che considero interessanti per evidenziare l'importanza del consumo di mangime durante la lattazione e le sue conseguenze più immediate:

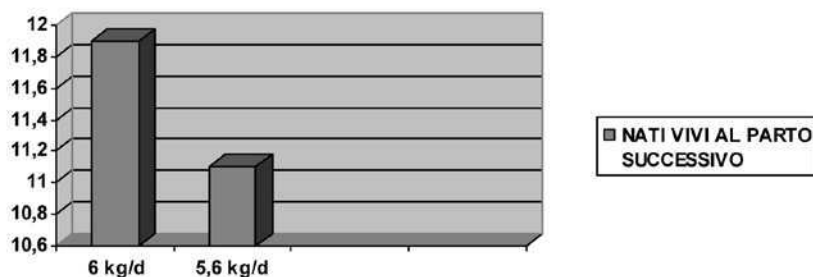


Grafico I – Relazione tra il consumo medio di mangime in lattazione con la prolificità al parto successivo (Young , 2004)

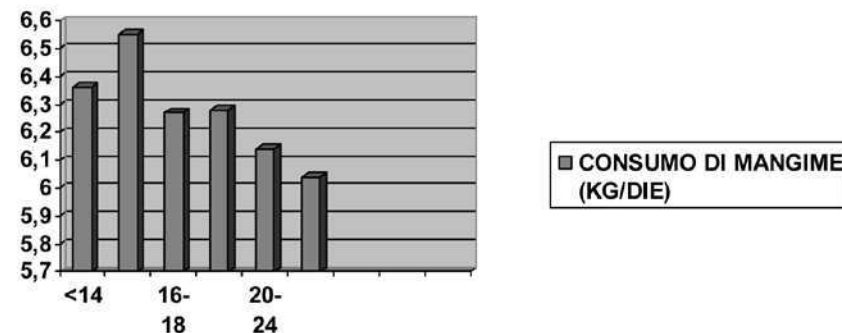


Grafico II – Relazione tra grasso dorsale all'ingresso in sala parto con il consumo medio di mangime durante la lattazione (Hytek R&D,2008) .

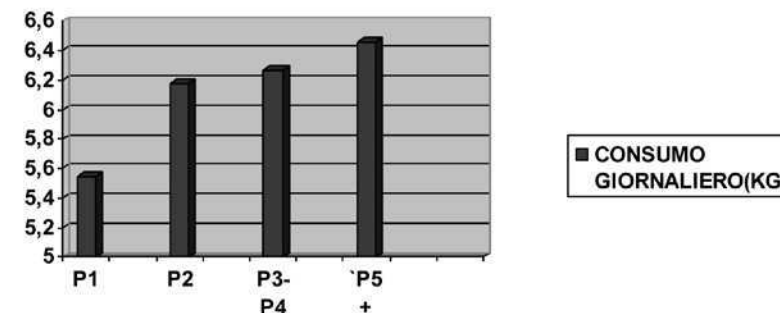


Grafico III – Relazione tra l'ordine di parto e il consumo medio di mangime in lattazione (Hytek R&D , 2008) .

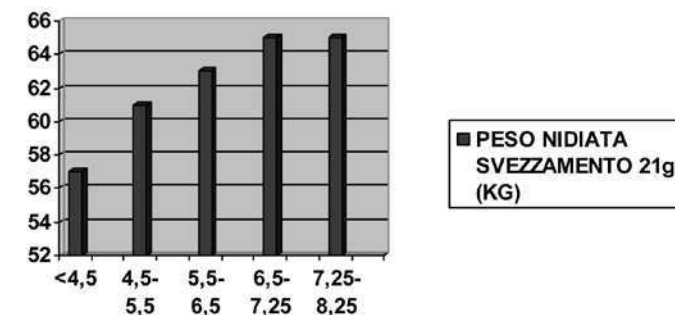


Grafico IV – Relazione tra il consumo medio giornaliero di mangime in lattazione con il peso della nidiata allo svezzamento (Hytek R&D , 2008) .

CONCLUSIONI

Visto tutto il background della produzione suina ed essendo il mangime da lattazione quello di maggior valore economico in un allevamento dopo quello dei suinetti, i razionamenti durante la fase di lattazione non influiscono per più dell'8% sul costo finale di produzione; la loro messa a punto dunque si colloca a metà strada fra la scienza e l'arte applicata

La corretta applicazione del razionamento delle scrofe è essenziale per la produttività presente e futura del nostro gruppo di riproduttori. Mantenere un'adeguata condizione corporea basata su un programma di controllo del razionamento ben compreso dal personale d'azienda ci permette di ottimizzare il consumo di alimento per ogni scrofa in questa fase critica.

Così un buon programma di alimentazione durante la lattazione deve ridurre al minimo la perdita di condizione corporea sia di grasso come soprattutto di proteina nelle scrofe di genetica europea. Al contrario, nelle scrofe iberiche un corretto razionamento deve permetterci un minimo di perdita di peso in base alla quantità di grasso corporeo accumulato.

Per adeguare le necessità di nutrienti nella dieta delle scrofe in lattazione dobbiamo, dunque, conoscere la loro capacità di ingestione, il peso delle scrofe e il loro ciclo produttivo; non ultimo è fondamentale conoscere il peso stimato della nidiata al momento dello svezzamento.



BIBLIOGRAFIA

- 1- Allee, GL (2007). *Aminoacid nutrition of the high performing lactation sow* . *Western Nutrition Conference* . Saskatoon . SK
- 2- Aherne , FX (1998) . *Feeding and management of lactating sow*. *19th Swine Symposium* , St. Hyacinthe , QC
- 3- Boyd , DR et al (2002). *Nutrition and management of the sow to maximize lifetime productivity*. *Advances in Pork Production 13:47 – Banff Pork Seminar* . Univ. of Alberta , Edmonton , AB
- 4- Dan Bussieres (2008). *Nutritional considerations for the high producing sow to maximize performance*. *39th American Association of Swine Veterinarian Annual Meeting* , San Diego , California Seminar # 5 17-31
- 5- Etienne, M et al (2000). *Milk production in the sow*. *Journées de Recherche Porcine en France* , 32 , 253-264
- 6- NRC (1998). *Nutrient requirement of swine* . Tenth Edition
- 7- *National Swine Nutrition Guide (2012)* . *Nutrient requirement of swine* . US Porc Center
- 8- Pluske, JR et al (1998). *Feeding lactating primiparous sows to establish three divergent metabolic states : Milk product and pig growth* . *J. Anim. Sci.* 76:1165-1171
- 9- Tokach, M (2007). *Gestation and lactation nutrition*. *13th Discovery Conference*. *Sow Longevity lifetime Seminar*. Nashville , Indiana .
- 10- Vignola , M (2009) . *Sow feeding management during lactation* . *London Swine Conference – Tools of the Trade* 1-2 April 2009

ATTI DEL XL MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA

**LA SCROFA IN SALA PARTO:
E' POSSIBILE INTERVENIRE PER MIGLIORARNE
LE PERFORMANCES? PARTE II**

IL CONTROLLO DELLA PRRS

MICHELE DRIGO

*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS),
Università di Padova, Legnaro, Italia*

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni abbiamo conosciuto grandi miglioramenti nei sistemi di produzione zootecnica in generale e nella filiera suinicola in particolare. I contributi derivanti dalla ricerca nei settori della genetica, dell'alimentazione, della gestione dei flussi animali e della progettazione degli edifici, hanno contribuito a migliorare l'efficienza produttiva, la redditività e il benessere degli animali. Tuttavia, le malattie infettive rappresentano ancora oggi un grave ostacolo sulla strada della sostenibilità del settore suinicolo. A questo proposito la cooperazione e il coordinamento tra allevatori, produttori, veterinari e ricercatori, rappresentano un approccio imprescindibile per lo sviluppo di metodi sempre più efficaci e innovativi per il controllo delle malattie infettive degli animali allevati a scopi produttivi. Questo obiettivo è mirato non solo a contenere le perdite economiche, ma corrisponde anche alla necessità di ridurre l'utilizzo a scopo profilattico degli antibiotici e di aumentare il benessere degli animali, aspetti che hanno un impatto rilevante sulla salute pubblica, sull'opinione pubblica e sulle aspettative dei consumatori.

Più di 20 anni dopo il suo avvento, la PRRS continua ad avere grande impatto sulla salute e il benessere dei suini di tutto il mondo, causando sostanziali perdite economiche. Negli anni sono state implementate diverse strategie di controllo basate sulla gestione zootecnica, sull'applicazione di misure di biosicurezza e sull'utilizzo di vaccini con l'obiettivo di debellare la malattia. Nonostante questo il virus della PRRS è stato in grado di espandersi invadendo anche il continente asiatico con particolare aggressività e spesso riemerge negli allevamenti dopo l'eradicazione, indicando che le diverse strategie di controllo attuali non sono del tutto efficaci e che l'epidemiologia del virus è molto complessa.

Le difficoltà nel controllo della PRRS a livello globale dipendono dall'inadeguatezza o addirittura assenza di strategie di controllo in molti paesi nonché dalla mancanza di metodi diagnostici e strategie di controllo armonizzati e in alcuni casi specifici anche dalle scarse conoscenze sulla reale prevalenza della malattia.

In questo contesto, si è costituita una rete europea "EuroPRRSnet", finanziata dalla COST Action FA902 e dedicata alla comprensione e alla definizione di strategie di lotta verso la PRRS. Più di 20 paesi europei hanno aderito a questo network con lo scopo di sviluppare una ricerca multidisciplinare sulla PRRS favorendo la collaborazione e la costruttiva ed efficace discussione tra ricercatori provenienti da diversi paesi, inclusi Stati Uniti ed Asia, riguardo a epidemiologia, immunopatologia, sviluppo di vaccini e armonizzazione degli strumenti di diagnostica.

La PRRS va vista come una problematica sanitaria che mette in discussione l'alternativa classica "controllo vs eradicazione", poiché né azioni rivolte al controllo né azioni rivolte all'eradicazione garantiscono efficacia soddisfacente. Per comprendere meglio tale affermazione e calarla nel contesto odierno, il ragionamento deve ripercorrere alcuni aspetti fondamentali relativi alla epidemiologia, immunopatogenesi e diagnosi di PRRSV.

Considerazioni epidemiologiche

PRRSV è un patogeno emerso a livello globale tra la fine degli anni '80 e l'inizio degli anni '90, anche se analisi filogenetiche accurate collocano il più recente antenato comune per i due genotipi, l'Europeo EU (o Tipo 1) e l'Americano NA (o Tipo 2) almeno 100 anni indietro nel tempo, indicando che si sono evoluti separatamente prima della loro comparsa come entità cliniche (Shi et al., 2010; Stadejek et al., 2013).

All'interno del genotipo Tipo 1 solo il sottotipo 1 (prototipo Lelystad) circola in Europa centrale e occidentale. Nell'Europa dell'Est è stata evidenziata una variabilità sorprendente che ha condotto all'identificazione di nuovi sottotipi (il 2, il 3 e il 4). Questo rilievo dimostra una variabilità genetica anche più elevata di quella osservata nel genotipo NA in Nord America, complicando molto l'epidemiologia a livello mondiale di PRRSV. Gli stipiti del sottotipo 2 (prototipo Bor) e del sottotipo 3 (prototipo Lena) si sono dimostrati più virulenti di quelli appartenenti al sottotipo 1 (prototipo Lelystad), alcuni addirittura così virulenti e patogeni quanto quelli caratterizzati da "febbre alta" in Asia. Questi ultimi sono stipiti di una variante estremamente aggressiva di PRRSV Tipo 2, apparsa in Cina nel 2006, e che sta tuttora determinando grossi danni all'intera produzione suina asiatica caratterizzandosi per febbre alta e duratura, problemi sia riproduttivi che respiratori e alta mortalità.

Nei Paesi dell'Europa occidentale storicamente il virus PRRS è stato principalmente collegato a problemi riproduttivi con febbre e sintomi respiratori poco rappresentati (come riportato anche in studi sperimentali), facendo ipotizzare una stabilità evolutiva dal punto di vista patogenetico degli stipiti di PRRSV circolanti. Dalla metà del 2013 però, il virus della PRRS è stato identificato come responsabile di sintomi simil-influenzali in comparti di svezzamento in Belgio e probabilmente anche in Paesi confinanti. A conferma di ciò, uno studio sperimentale che ha previsto l'inoculo di uno di questi isolati, *Flanders-13*, ha consentito di registrare costantemente febbre alta e problemi respiratori (Nauwynck, EuroPRRS meeting, 2013).

I sottotipi appartenenti al PRRSV genotipo Tipo 1 mostrano anche differenze in termini di lunghezza della proteina del nucleocapside, di dimensioni variabili comprese tra i 124-132 amminoacidi a seconda del sottotipo. Sorprendentemente, tale variabilità colpisce la porzione C-terminale, solitamente contraddistinta da forti vincoli strutturali. Tale divergenza all'interno dei sottotipi di PRRSV genotipo Tipo 1 ha prodotto un alto tasso di risultati falsamente negativi di RT-PCR utilizzata a fini diagnostici (Toplak, 2012), e può anche ridurre l'affidabilità dei test sierologici che utilizzano come antigene la proteina del nucleocapside.

Gli stipiti americani, che derivano dal genotipo NA (Tipo 2), si sono evoluti velocemente grazie a fenomeni di ricombinazione e drift genetico, dando origine a nuovi stipiti più virulenti e difficili da controllare con i vaccini disponibili (PRRSV atipico o SAMS – *Sow Abortion and Mortality Syndrome*).

Il genotipo Tipo 2 di PRRSV in Europa è sempre apparso geneticamente omogeneo, considerata anche la sua introduzione, avvenuta tramite l'utilizzo di vaccini vivi attenuati. Sono però ormai evidenti successive introduzioni indipendenti di suoi stipiti di campo virulenti. È il caso dei due stipiti di PRRSV genotipo Tipo 2 circolanti in Slovacchia ed Ungheria che appartengono allo stesso cluster genetico MN184 derivante dal Nord America (Stadejek et al., 2013).

La diversità genetica ampia di PRRSV genotipo Tipo 1 in Europa, e la presenza di diversi stipiti di genotipo Tipo 2 di PRRSV, rendono evidente l'importanza di più ampi e sistematici studi di filogenesi molecolare per comprendere appieno l'epidemiologia di PRRSV in Europa, per mettere a punto strumenti diagnostici affidabili a supporto della gestione di questa malattia in allevamento e poter meglio valutare le potenziali conseguenze della diffusione endemica

del virus e di eventuali introduzioni esotiche.

Alcuni autori asseriscono inoltre che la ricombinazione sia un meccanismo che contribuisce in modo importante alla diversità genetica di PRRSV (Murtaugh et al., 2010), con effetti sulla patogenesi (Shi et al., 2013), sull'evasione dalla risposta immunitaria e sull'insuccesso diagnostico.

La capacità evolutiva di PRRSV impone di guardare a quest'aspetto con studi di evoluzione virale, sfruttando la capacità di analizzare in modo più esaustivo l'informazione genetica grazie alle moderne tecniche di sequenziamento (Martín-Valls et al., 2013). Se nel recente passato non era facilmente praticabile poter sequenziare l'intero genoma virale, attualmente sono disponibili infatti sistemi di sequenziamento più abordabili per costi e gestione (Kvisgaard et al., 2013).

Per ottenere il massimo beneficio dalle nuove tecniche di indagine andrebbero indagate sia situazioni problema che situazioni di relativa "pace clinica" sequenziando altre porzioni genomiche rispetto alle classiche ORF5 e ORF7. Infatti, queste hanno importanza da un punto di vista diagnostico (ORF7) e di epidemiologia aziendale, ovvero per la tracciabilità storica degli stipiti circolanti, ma non sono sufficienti per delineare a livello molecolare il rapporto virus-ospite in tutti i molteplici aspetti che governano tale interrelazione.

Proprio questo tema è stato oggetto di interesse nell'ambito dei lavori dello EuroPRRSnet, ponendolo al centro degli impegni di ricerca del prossimo futuro per arrivare alla definizione di strumenti di profilassi validi universalmente.

Immunopatologia

È plausibile che l'insorgenza della malattia in suini della stessa età sia il prodotto di 3 componenti distinte: i) la patogenicità del virus (non ancora ben compresa fino ad oggi); ii) la razza (susceptibilità: Hampshire > Large White > Duroc > Landrace) (Lewis et al., 2007) e il fenotipo (linee magre vs non magre); iii) le condizioni ambientali.

Tutti e tre questi fattori possono influenzare notevolmente l'insorgenza della malattia e/o la prevalenza a livello aziendale comportando una grande variabilità della forma clinica, da inapparente a letale, con ampie fluttuazioni della morbilità e letalità, e delle perdite economiche dirette e indirette (Zimmerman et al., 2006).

La malattia può avere talvolta estrema gravità, come nelle epidemie caratterizzate da "febbre alta" sostenute dagli stipiti cinesi e da alcuni stipiti di PRRSV identificati in Bielorussia (Karniychuk et al., 2010). In questi casi è molto probabile che la sinergia tra PRRSV e LPS batterici giochi un ruolo cruciale amplificando la risposta infiammatoria dei macrofagi infetti (Qiao et al., 2011). Infatti, un grave decorso clinico di PRRS si dimostra correlato a una forte risposta infiammatoria (Morgan et al., 2013).

La patogenesi di PRRSV è completamente governata dall'azione dei macrofagi tissutali; negli ultimi 20 anni gli stipiti del sottotipo 1 (prototipo Lelystad) hanno replicato con continuità nei suini, sfruttando come target i macrofagi portatori del recettore per la sialoadesina, presenti ad alte concentrazioni in vari tessuti quali tonsille, polmoni, linfonodi, milza, endometrio della scrofa e placenta. Tali macrofagi sono invece presenti in basse concentrazioni in tutti gli altri tessuti del suino.

PRRSV replica primariamente nelle tonsille e in parti più profonde del tratto respiratorio e poi nei tessuti linfoidi interni. Poiché le cellule muoiono per apoptosi, l'infiammazione è limitata e patologia e segni clinici sono moderati (genotipo Tipo 2 > genotipo Tipo 1). I monociti giocano un ruolo centrale nella risposta immunitaria innata e la loro distruzione durante l'infezione da PRRSV può portare a catastrofici segni clinici a seguito di co-infezioni con altri patogeni o esposizione a LPS batterici.

PRRSV attraversa la placenta solo dopo i 70 giorni di gestazione e questo si spiega secondo due ragioni: i) assenza del recettore per la sialoadesina sui macrofagi placentari nell'allantocorion e (ii) presenza di difesa efficace contro le cellule infettate da PRRSV.

Gli stipiti di PRRSV appartenenti al sottotipo 3 (prototipo Lena) emersi in Europa Orientale differiscono immunopatologicamente rispetto a quelli simil-Lelystad perché sono in grado di infettare una nuova sottopopolazione di macrofagi tissutali che non possiedono il recettore per la sialoadesina, sfruttando probabilmente un nuovo recettore di membrana. L'aspetto cruciale di questa evidenza è che essendo questi macrofagi presenti ad alte concentrazioni nell'epitelio respiratorio, permettono una replicazione più intensa nei tessuti respiratori (fino a 10-100 volte rispetto agli altri stipiti), conducendo a una più elevata eliminazione virale e ad una elevata viremia (fino a 100 volte maggiore). Questi stipiti inoltre, sono responsabili di forme cliniche più aggressive con danni vascolari, febbre prolungata ed elevata, anche fino a 3-4 settimane in seguito a co-infezioni, poiché vengono invase e distrutte quelle cellule monocitiche epiteliali e sub-epiteliali, responsabili del contrasto all'attacco di altri agenti patogeni. Questo rilievo spiega anche come mai la sepsi sia regolarmente osservata negli animali infettati con stipiti del sottotipo 3 (Lena) di PRRSV.

I nuovi stipiti simil-Flanders-13 stanno evolvendo nella stessa direzione e, dato il loro tropismo, contrariamente a quanto avviene per gli stipiti del sottotipo 1, è abbastanza facile rinvenirli nelle secrezioni nasali. La diagnosi eziologica può essere pertanto fatta più agevolmente da tamponi nasali sottoposti a titolazione virale mediante qRT-PCR che durante un episodio di sindrome riproduttiva in cui, data la patobiologia del fenomeno, il target diagnostico di qRT-PCR è costituito da cordone ombelicale e polmoni/milza fetali.

Novità sullo sviluppo di vaccini per la PRRS

Il virus della PRRS è un obiettivo difficile per l'immunità come emerge da molti studi che descrivono le *défaillances* dei meccanismi immunitari a seguito dell'interazione virus/ospite: i) sono indotti bassi livelli di interferone; ii) anche se i titoli anticorpali si innalzano dopo circa 8 giorni dall'infezione, ci vogliono alcune settimane per rilevare una debole neutralizzazione; iii) le cellule natural-killer e i linfociti T-citotossici non sono efficaci.

Solo gli anticorpi neutralizzanti assieme a qualche altro non ben identificato meccanismo mediato da cellule killer del suino sono i meccanismi immunitari che possono agire nel contrastare PRRSV e che dovrebbero essere attivati dalla vaccinazione.

La continua variabilità genetica espressa da PRRSV lo rende un bersaglio dinamico e complica la realizzazione di una strategia vaccinale universalmente efficace. Nel prossimo futuro sarà imperativo che i vaccini siano facilmente adattabili, includendo rapidamente nella propria composizione stipiti molto vicini a quelli circolanti nel territorio. Per realizzare ciò sono necessarie anche procedure di registrazione rapide per cambiare il virus vaccinale in breve tempo. In generale al fine di ridurre la replicazione del virus dopo infezione e bloccarne la trasmissione tra suini a livello aziendale, è importante avere:

- i) vaccini inattivati, per aumentare l'immunità umorale nelle scrofe in modo da proteggere i feti in utero da un'infezione transplacentare grazie alla presenza di anticorpi neutralizzanti nel sangue materno e per proteggere i suinetti dall'infezione durante le loro prime settimane di vita tramite anticorpi neutralizzanti nel colostro;
- ii) vaccini vivi attenuati o con vettore ricombinante da usarsi su animali da rimonta naive e suini da ingrasso. L'obiettivo è quello di ridurre la trasmissione di PRRS dalla madre al feto/neonato e tra i suini da ingrasso/riproduttori.

La tecnologia per realizzare efficaci vaccini inattivati adattabili è già disponibile come riportato da Karniychuk et al. 2012, dando luogo al primo vaccino inattivato di nuova generazione in

grado di aumentare il livello di anticorpi neutralizzanti e di dare una buona protezione negli animali naive. Con questo vaccino, è possibile migliorare l'immunità umorale delle scrofe gravide, in particolare aumentare il titolo di anticorpi neutralizzanti, per assicurare la protezione dei feti in utero e la protezione dei suinetti tramite il colostro. È pertanto ideale richiamare l'immunità nelle scrofe a 60 giorni di gestazione, poco prima del periodo suscettibile di una diffusione transplacentare di PRRSV, e a 90 giorni di gestazione, poco prima del trasferimento transepiteliale di anticorpi dal sangue al colostro.

La vera sfida è di riuscire a sviluppare vaccini vivi attenuati con vettori ricombinanti che diano la migliore immunità protettiva a scrofette naive e suini da ingrasso a una condizione garantendo una stretta correlazione tra stipiti vaccinali e stipiti di campo. Considerando gli aspetti di sicurezza i vaccini ricombinanti sono preferibili, meglio se di tipo DIVA, cioè che consentano di seguire l'impatto della vaccinazione sulla circolazione del virus selvaggio.

Tramite sistemi di *reverse genetic*, i geni che codificano per i fattori di virulenza e per le proteine/peptidi in grado di sopprimere la risposta immunitaria dovrebbero essere rimossi mentre i geni che codificano le proteine/peptidi coinvolti nell'immunità protettiva dovrebbero essere mantenuti, anzi possibilmente modificati per migliorarne l'immunogenicità. Un'altra frontiera potrebbe essere quella di ingegnerizzare vaccini ricombinanti, rendendoli vettori solamente di fattori di immunogenicità. Poiché nel caso di questi vaccini ricombinanti non sono espressi i fattori di soppressione della risposta immunitaria, questi possono indurre una forte immunità soprattutto quando somministrati per via intranasale. Nel momento in cui questi vaccini vivi potranno essere sviluppati in modo riproducibile, potranno velocemente essere adattati agli stipiti emergenti.

Aspetti diagnostici biomolecolari

L'RT-PCR è un metodo ampiamente utilizzato per l'identificazione di PRRSV, perché è uno strumento diagnostico rapido, sensibile e altamente specifico. Tuttavia, la profonda diversità e rapida evoluzione genetica degli stipiti di PRRSV complica lo sviluppo di metodi altamente sensibili e robusti. Diversi fattori devono essere presi in considerazione quando venga usata l'RT-PCR per la diagnosi di PRRSV.

Una grande varietà di diversi saggi e protocolli di RT-PCR sono utilizzati in laboratori diagnostici pubblici e privati in tutta Europa, ma solo alcuni di questi sono stati pubblicati e i dati di convalida in generale non sono disponibili. Uno degli sforzi maggiori che andrebbe perseguito dovrebbe essere quello di proporre attività di ricerca con l'obiettivo di migliorare, validare, implementare e standardizzare le procedure diagnostiche utilizzate in Europa e nel mondo. Recentemente, un Ring Test per valutare real-time RT-PCR come metodi di rilevamento di PRRSV in diversi laboratori europei ha dimostrato che nessuna delle metodiche in-house o dei kit commerciali testati, è stata in grado di identificare tutti i diversi ceppi di PRRSV con una sensibilità analitica e diagnostica ottimale (Wernike et al. 2012). Per questo motivo si suggerisce sempre di combinare più metodi assieme.

Inoltre, PRRSV è un virus a singolo filamento di RNA, soggetto a deriva antigenica. Alcuni studi hanno dimostrato che in alcuni paesi europei come Lituania, Lettonia, Bielorussia e Russia circolano stipiti straordinariamente diversi di PRRSV genotipo Tipo 1 (Stadejek et al. 2008). Gli allineamenti delle sequenze di questi stipiti con quelle dei primer e delle sonde dei saggi di RT-PCR pubblicati per PRRSV hanno indicato che la maggior parte non sarebbe in grado di riconoscere questi stipiti recenti. L'aggiornamento dei dati di sequenza di PRRSV provenienti da molte parti d'Europa è molto scarso e quindi non è facile quantificare le probabilità di falsa negatività dei vari saggi in uso. Pertanto è evidente che vi è una necessità di programmi di sorveglianza al fine di controllare continuamente la deriva di

PRRSV mediante il sequenziamento dei sottoinsiemi di stipiti circolanti e la costruzione di un database di sequenze di PRRSV congiunto e accessibile al pubblico. Il sequenziamento che tradizionalmente si concentra sui segmenti ORF5 e ORF7, non può più limitarsi ad essi. Attualmente però le sequenze complete del genoma di stipiti di PRRSV depositate in GenBank non sono molte, e solo aumentandone il numero si potrebbe provare ad individuare altre regioni conservate rispetto al diffuso ORF7, che possano diventare il target diagnostico di saggi di real-time RT-PCR sensibili e robusti.

Infine, per ottimizzare le prestazioni diagnostiche di saggi RT-PCR, è necessario implementare per ogni campione diagnostico sistemi di controllo interno anche per le procedure di estrazione di RNA. Parallelamente, è molto importante controllare costantemente primer e sonde nella loro capacità di rilevare nuove varianti di PRRSV sia tramite adeguate analisi *in silico* che tramite la partecipazione a ring trials.

Considerazioni sul controllo di PRRSV a livello di area

L'implementazione di programmi di eradicazione a livello di area geografica trova motivazioni nella necessità di incrementare i profitti. Il processo deve essere guidato da comunicazione, educazione e controllo a livello locale. Un immediato beneficio in un simile scenario deve essere il miglioramento generale della biosicurezza e un'augmentata attenzione all'impatto delle malattie infettive sul sistema produttivo. Nel medio termine questi sforzi dovrebbero culminare nella stabile eliminazione di PRRSV, seguita nel lungo termine dall'eliminazione di altre malattie infettive, grazie alle infrastrutture che si sono sviluppate.

Esiste un crescente interesse in diversi Paesi nell'implementare piani di controllo ed eliminazione di PRRSV a livello di area geografica. In Danimarca nel 2013 si è costituito un gruppo di esperti a cui il Ministero dell'Agricoltura ha commissionato la redazione delle linee guida di un piano nazionale di eradicazione per PRRSV e stima dei relativi costi.

In Belgio sono riportati alcuni progetti locali di controllo basati sul mantenimento della negatività di centri verri, sia in aree ad alta che a bassa densità di suini.

L'Ungheria nel 2013 ha pianificato un programma di controllo ed eliminazione a livello nazionale, regolato dal Ministero dell'Agricoltura, basato sull'obbligatorietà per ogni allevamento di definire il proprio status sanitario per PRRSV tramite screening sierologico gestito da un Laboratorio Nazionale di Referenza e a carico dell'allevatore. A seguito di risultato sieropositivo deve essere pianificato un piano di eradicazione per l'allevamento. Animali da rimonta possono essere introdotti nel territorio ungherese solo da centri PRRSV-free (con risultati diagnostici negativi non più vecchi di 14 giorni), devono essere mantenuti in quarantena per almeno 60 giorni e testati al momento del loro arrivo e successivamente entro l'inizio dell'ultima settimana di quarantena.

Negli Stati Uniti programmi di controllo ed eradicazione a livello locale sono stati avviati su base volontaria già da alcuni anni come ad esempio nella Stevens County in Minnesota. PRRSV è stato eliminato dalla maggior parte dei siti all'interno della regione e l'area interessata è stata via via ampliata per includere contee adiacenti. Il programma ha avuto un discreto successo e dimostra l'esistenza di organizzazione a livello locale, spirito di cooperazione e volontà di eliminare il virus dalla regione (Corzo et al., 2010). In Nord America il concetto di un controllo, voluto dai produttori, su base volontaria e coordinato a livello regionale, si è ormai radicato portando all'attuazione di circa una ventina di altri programmi simili a livello regionale. Nelle regioni ad alta densità suinicola degli Stati Uniti, un numero crescente di allevamenti sta modificando il sistema di ventilazione implementando sistemi di filtrazione dell'aria. Le analisi dei dati epidemiologici dimostrano una riduzione dell'85% dell'incidenza di focolai in questi allevamenti rispetto ai 5 anni precedenti l'implementazione di sistemi di filtrazione e le

analisi del ritorno economico dell'adozione di tali sistemi confermano come rappresentino un investimento attraente per le aziende situate in regioni ad alta densità di suini. Nel complesso, il controllo coordinato nelle regioni a bassa media densità suinicola e la filtrazione dell'aria in quelle ad alta densità hanno condotto ad un controllo efficace della PRRS, che rende credibile la sua eventuale eliminazione in un futuro prossimo.

In Italia al momento non esistono programmi coordinati per il controllo e l'eliminazione della PRRS, nemmeno a livello locale. La concentrazione geografica della produzione suinicola nelle regioni dell'Italia Settentrionale, la presenza di molti allevamenti a ciclo chiuso o comunque col magronaggio, in cui è difficile interrompere la circolazione virale e la mancanza di elevati livelli di biosicurezza omogeneamente diffusi sono le principali cause di questa situazione. Inoltre l'epidemiologia di PRRSV si dimostra più complessa per quanto riguarda la variabilità genetica degli stipiti circolanti rispetto a quella di altri paesi europei e non è infrequente avere situazioni di circolazione contemporanea di più stipiti a livello aziendale. In questo contesto veterinari e produttori agiscono principalmente attuando strategie di controllo il cui successo si fonda principalmente sulla buona gestione della scrofette da rimonta e sulla esistenza di piani di emergenza in grado di reagire quando si verifica un nuovo focolaio di malattia. Esperienze di eradicazione sono limitate solamente a livello di singoli allevatori/sistemi produttivi.

Considerazioni sul controllo di PRRSV a livello di azienda

Il controllo e l'eliminazione della PRRS sono ancora una sfida continua e frustrante per ricercatori, professionisti e allevatori. Le misure di controllo variano a seconda delle categorie di animali, dei sistemi di produzione adottati (ciclo chiuso, ciclo aperto, solo ingrasso) e del numero di siti in cui è diviso il sistema produttivo. In linea generale, l'obiettivo primario nel controllo della PRRS a livello aziendale è quello di produrre suinetti svezzati negativi alla PCR e le misure di controllo sono principalmente finalizzate a: i) indurre una risposta immunitaria protettiva e omogenea al virus residente in tutta la popolazione (evitando quindi la presenza di sub-popolazioni di animali suscettibili); ii) evitare l'ingresso e coesistenza di stipiti geneticamente diversi (eterologhi) soprattutto con l'introduzione di animali infetti (scrofette da rimonta principalmente), sperma e altre potenziali fonti di virus. A questo scopo è sempre necessaria l'attuazione di rigide misure di biosicurezza: i) quarantena per gli animali da rimonta, che devono essere acclimatati e controllati prima della loro introduzione nel comparto produttivo; ii) controllo e disinfezione dei mezzi di trasporto in entrata; iii) gestione del personale in entrata, con un locale idoneo al lavaggio e al cambio d'abito; iv) divieto della libera entrata di estranei in allevamento. Non meno importanti sono le misure di biosicurezza interna, ovvero tutte le routine lavorative che minimizzano il trasferimento di materiale potenzialmente infetto tra i diversi comparti produttivi dell'allevamento.

La "stabilizzazione della mandria" è la base di qualsiasi programma di controllo in un allevamento da riproduzione. Un allevamento può essere definito come "stabile" quando non si registra trasmissione di PRRSV dalle scrofe ai suinetti sia prima (trasmissione verticale) che dopo la nascita (trasmissione orizzontale). Questa condizione può avvenire se non si hanno virus di nuova introduzione che infettano le scrofe gravide, e la popolazione è immune e protetta verso il virus residente.

A seguito di un focolaio di PRRS tale livello può essere raggiunto con la chiusura dell'allevamento, ovvero impedendo temporaneamente l'entrata di nuovi soggetti da rimonta per un tempo sufficientemente lungo (90-120 giorni), quindi introducendo rimonta negativa in combinazione con acclimatemento in locali di quarantena/isolamento (sito 0) e vaccinazione. In un allevamento a ciclo chiuso potrebbe anche essere necessario un depopolamento totale o parziale nei settori dello svezzamento e/o dell'ingrasso. Per ottenere invece l'eliminazione

del virus varie esperienze di campo indicano in almeno 210 giorni il tempo di chiusura dell'allevamento necessario a seguito di esposizione contemporanea di tutto l'effettivo o al/ai virus residente/i o a vaccinazione con vaccino vivo attenuato.

CONCLUSIONI

La natura di rapida evoluzione di PRRSV richiede un sistema altrettanto dinamico che riesca a tenerne il passo attraverso ricercatori motivati e promotori di continui approfondimenti accurati, informativi e condivisi. Queste conoscenze dovrebbero servire alla revisione e/o rafforzamento delle misure di controllo e allo sviluppo di vaccini efficaci. Sono già stati sviluppati software che consentono prestazioni *user-friendly* di analisi filogenetiche ma il reale successo e il valore di tali strumenti si collega strettamente alle iniziative individuali di voler condividere i dati di sequenza. Solo allora si potrà progredire realmente verso una prospettiva multidisciplinare di comprensione dell'evoluzione e dell'epidemiologia molecolare di PRRSV.

Ulteriori sforzi di ricerca devono ancora essere fatti per comprendere completamente i meccanismi che regolano l'interazione virus-ospite, soprattutto nelle condizioni di campo, in cui anche i fattori ambientali rivestono un ruolo cruciale nel determinismo della patologia.

La sfida dell'eradicazione di PRRSV non sembra realistica finché non saranno sviluppati strumenti di controllo più efficaci e approcci diagnostici armonizzati; inoltre, ma non secondariamente, per raggiungere un tale obiettivo è fondamentale che si progettino iniziative coordinate e adeguatamente supportate economicamente.

References

- Corzo C.A., Mondaca E., Wayne S., Torremorell M., Dee S., Davies P., Morrison R.B., 2010 "Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus". *Virus Res*, 154, 185-192.
- Karniychuk U.U., Saha D., Vanhee M., Geldhof M., Cornillie P., Caij A.B., De Regge N., Nauwynck H.J. (2012) "Impact of a novel inactivated PRRS virus vaccine on virus replication and virus-induced pathology in fetal implantation sites and fetuses upon challenge". *Theriogenology*, 78, 1527-37.
- Karniychuk, U.U., Geldhof, M., Vanhee, M., Van Doorselaere, J., Saveleva, T.A., Nauwynck, H.J. (2010) "Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate". *BMC Vet Res* 6, 30.
- Kvisgaard L.K., Hjulsager C.K., Fahnøe U., Breum S.Ø., Ait-Ali T., Larsen L.E. (2013) "A fast and robust method for full genome sequencing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Type 1 and Type 2". *J Virol Methods*, 193, 697-705.
- Lewis C.R., Ait-Ali T., Clapperton M., Archibald A.L., Bishop S. (2007) "Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol*, 20, 343-358.
- Martín-Valls G.E., Kvisgaard L.K., Tello M., Darwich L., Cortey M., Burgara-Estrella A.J., Hernández J., Larsen L.E., Mateu E. (2013) "Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidences supporting that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates". *J Virol*. 2013 [Epub ahead of print].

Morgan S.B., Graham S.P., Salguero F.J., Sanchez Cordon P.J., Mokhtar H., Rebel J.M., Weesendorp E., Bodman-Smith K.B., Steinbach F., Frossard J.P. (2013) "Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance". *Vet. Microbiol*, 163, 13-22.

Murtaugh M.P., Stadejek T., Abrahante J.E., Lam T.T., Leung F.C. (2010) "The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus". *Virus Res* 154, 18-30.

Nauwynck H.J. (2013) "The practical impact of PRRS pathogenesis on diagnostics and control". EuroPRRSnet COST Action FA902 Final meeting, Heraklion, Greece, 17-19 October 2013, 8-10.

Qiao S., Feng L., Bao D., Guo J., Wan B., Xiao Z., Yang S., Zhang G. (2011) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin act in synergy to amplify the inflammatory response of infected macrophages". *Vet. Microbiol*, 149, 213-220.

Shi M., Holmes E.C., Brar M.S., Leung F.C. (2013) "Recombination is associated with an outbreak of novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China". *J Virol*, 87, 10904-7.

Shi M., Lam T.T., Hon C.C., Hui R.K., Faaberg K.S., Wennblom T., Murtaugh M.P., Stadejek T., Leung F.C. (2010) "Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective". *Virus Res*, 154, 7-17.

Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., Timina A.M., Krabbe J.S., Chabros K., Potapchuk D. (2008) "Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe". *Arch Virol*, 153, 1479-88.

Stadejek T., Stankevicius A., Murtaugh M.P., Oleksiewicz M.B. (2013) "Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play". *Vet Microbiol*, 165, 21-8.

Toplak I., Rihtarič D., Hostnik P., Grom J., Stukelj M., Valenčak Z. (2012) "Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests". *J Virol Methods*, 179, 51-6.

Wernike K., Bonilauri P., Dauber M., Errington J., LeBlanc N., Revilla-Fernández S., Hjulsager C., Isaksson M., Stadejek T., Beer M., Hoffmann B. (2012) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods". *J Vet Diagn Invest*, 24, 855-66.

Zimmerman J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Tottmorell M. (2006) "Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)". In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine* 9th Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 387-417.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DI UN TRATTAMENTO A BASE DI PROGESTINICO E DI PROGESTINICO ASSOCIATO A GONADOTROPINE SULLE SCROFETTE PUBERI

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF TREATMENT WITH PROGESTINIC VERSUS PROGESTINIC-GONADOTROPIN ASSOCIATION IN PREPUBERTAL GILTS

SCOLLO A.¹, CATELLI E., CASAPPA P.², AMORICO A.¹, MAZZONI C.¹

¹ Medico Veterinario Suivet; ² Ceva Salute Animale

Parole chiave: scrofetta, gonadotropine, estro, progestinico

Key words: gilt, gonadotropin, estrus, progestin

Riassunto: Nell'allevamento suinicolo moderno, la gestione e l'introduzione della scrofetta nella carriera riproduttiva ricoprono un ruolo fondamentale, in quanto da questo animale dipende il futuro produttivo dell'azienda. Lo scopo del presente lavoro è quello di determinare l'efficacia della sincronizzazione degli estri sulle performance zootecniche di un gruppo di scrofette puberi sottoposte a trattamento farmacologico con solo progestinico (4mg/ml di Altrenogest), o con progestinico associato a successiva somministrazione di gonadotropine (eCG 80UI/ml e hCG 40UI/ml). I risultati suggeriscono che la somministrazione di eCG ed hCG in associazione 24 ore dopo la fine del trattamento con Altrenogest nelle scrofette, garantisce maggiore omogeneità tra la fine di quest'ultimo e la venuta in estro degli animali, consentendo un'ottimizzazione del management delle fecondazioni.

Abstract: In modern pig breeding, the management and the introduction of the gilt in the reproductive career play a key role, as from this depends the reproductive future of the herd. The aim of this work was to determine the effectiveness of synchronization of oestrus on the reproductive performances of a group of pubertal gilts subjected to pharmacological treatment with progestin-only (4mg/ml of Altrenogest), or with progestin associated with subsequent administration of gonadotropins (eCG 80UI/ml and hCG 40UI/ml). The results suggest that the administration of eCG and hCG in combination 24 hours after the end of treatment with Altrenogest in gilts, ensures greater uniformity between the end of the latter and the coming of the animals in estrus, allowing optimization of insemination management.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento suinicolo, la scrofetta richiede attenzioni estremamente particolari in quanto dalla sua delicata gestione dipende il futuro riproduttivo dell'intera azienda. Ricoprendo un ruolo cardine, i costi ad essa legati non sono trascurabili, ed un calo di efficienza può rapidamente tradursi in una tangibile perdita economica (1). Nella realtà zootecnica, ogni anno vengono riformate dal 30 al 50% delle scrofe per essere rimontate dalle scrofette (2); il successo di questa introduzione rappresenta una vera e propria sfida per il management dell'azienda. Sfortunatamente però, non è facile ottenere un numero sufficiente di scrofette pronte a garantire il tasso di rimonta, ed il successo dell'intera operazione passa necessariamente attraverso un'ottimizzazione dei flussi di questi animali. L'opportunità di poter decidere in che momento sincronizzare gli estri delle scrofette, ma soprattutto di poterli avere concentrati in un breve lasso di tempo, può rappresentare un punto di grande utilità per l'azienda. I risvolti positivi,

tanto sulla gestione del seme, certamente ottimizzato soprattutto qualora acquistato, quanto sulla gestione dei parti, a loro volta più concentrati nell'unità di tempo, possono veramente fare la differenza. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia della somministrazione per via orale dei progestinici nella sincronizzazione dell'estro in scrofette puberi, anche in una fase del ciclo estrale sconosciuta (2). Tuttavia, anche l'insorgenza del calore in animali sincronizzati con progestinici può avvenire in un arco di tempo non del tutto prevedibile e distribuirsi nell'arco di una settimana. Questo inconveniente è per la maggior parte attribuibile ad un insufficiente sviluppo follicolare. Con lo scopo di stimolare questo sviluppo e ottenere un maggiore effetto sincronizzante, negli ultimi anni la ricerca ha indirizzato la propria attenzione verso protocolli di sincronizzazione dell'estro che prevedano l'utilizzo di gonadotropine al termine del trattamento col progestinico (3). Diversi studi sono stati già condotti sugli effetti dell'associazione di queste due categorie di farmaci nella fisiologia delle scrofette (4, 5, 6), ma l'aspetto zootecnico delle performance seguenti alla sincronizzazione è stato investigato in misura minore.

Lo scopo del presente lavoro è quello di determinare le performance zootecniche di scrofette puberi sottoposte a trattamento farmacologico con solo progestinico (4mg/ml di Altrenogest), o con progestinico associato a successiva somministrazione di gonadotropine (eCG 80UI/ml e hCG 40UI/ml).

MATERIALI E METODI

Animali e management

Lo studio è stato condotto in un allevamento suinicolo commerciale a ciclo aperto, osservando le norme minime sulla protezione dei suini indicate dalla legislazione vigente (7). Per la prova sono state considerate 66 scrofette puberi in fase estrale sconosciuta, tutte di genetica ibrida commerciale Large White × Landrace. L'età media della pubertà era di circa 180 giorni di vita con un peso stimato intorno ai 100kg. L'ultima fase di selezione prima dell'introduzione nel reparto di gestazione è avvenuta valutando l'integrità degli appiombi, le dimensioni dei genitali esterni e la condizione corporea (BCS) (8). Il periodo di osservazione è iniziato in Marzo, concomitantemente al trasferimento delle scrofette nelle gabbie gestazione (attorno ai 7 mesi di vita e ad un peso di 120kg), ed è terminato in Maggio. Gli animali erano all'interno di un capannone a ventilazione forzata con pavimentazione in grigliato, mantenendo 8 ore di luce al giorno all'intensità di 300 lux. L'alimentazione era somministrata con sistemi automatizzati due volte al giorno (alle ore 07:00 e alle ore 16:00) secondo una formulazione standard, ed in ragione di 1,80 kg/capo/die di alimento. L'acqua era a disposizione ad libitum tramite un abbeveratoio a spillo. A tutte le scrofette è stato somministrato individualmente l'Altrenogest (4 mg/ml, Altresyn®, Ceva) al dosaggio di 20 mg (5 ml) per via orale, quotidianamente per 18 giorni in associazione al pasto della mattina. Il diciannovesimo giorno di trattamento (24 ore dopo l'ultima somministrazione di Altrenogest), 36 scrofette hanno ricevuto una somministrazione per via intramuscolare di 5 ml contenenti 400 UI di eCG e 200 UI di hCG (Gn) (Fertipig®, Ceva). Le rimanenti 30 scrofette hanno invece ricevuto 5 ml di soluzione placebo con le stesse modalità. Dal giorno 19 in poi è stata effettuata la ricerca degli estri con il verro due volte al giorno (alle ore 08:00 e alle ore 16:00); la registrazione della venuta in calore è stata effettuata alla manifestazione del riflesso dell'immobilità da parte dell'animale e delle tipiche caratteristiche dell'estro descritte da Signoret (9). Alla manifestazione del calore, le scrofette sono state fecondate alla presenza del verro, con inseminazione artificiale convenzionale, con cateteri a spugna e buste monodose da 90 ml per $2,6 \times 10^6$ spermatozoi vivi e vitali in extender a lunga conservazione. Il seme refrigerato, utilizzato entro le 24 ore dal prelievo, è stato depositato nelle vie genitali femminili con una prima dose al rilevamento dell'estro, ed a distanza di 24 ore

con una seconda dose secondo il protocollo suggerito da Almeida et al. (10). Gli animali sono stati dunque monitorati per l'intera gravidanza e gli eventuali ritorni in calori o aborti annotati. Oltre all'intervallo tra la fine del trattamento con Altrenogest e l'insorgenza del calore (per semplicità indicato nel testo come ISE-pt), sono stati calcolati i principali parametri riproduttivi degli animali, quali la fertilità ecografica, la portata al parto e la percentuale di calori entro l'ottavo giorno post trattamento. Inoltre, sono stati raccolti al parto i dati relativi al numero di nati totali, nati vivi, nati morti e mummificati per ciascuna scrofetta.

Analisi statistica

Le percentuali di portata al parto dei due gruppi sono state confrontate tramite l'analisi del chi-quadro, mentre per le percentuali di scrofette in calore entro gli 8 giorni dalla fine del trattamento è stato utilizzato il Fisher's exact test. Per l'ISE-pt, il numero di nati totali, nati vivi, nati morti e mummificati invece è stato utilizzato il t-test. La variabile ISE-pt è stata successivamente analizzata anche con il test chi-quadro per il confronto tra due distribuzioni di dati. Un ulteriore z-test è stato effettuato per il confronto tra frequenze di dati entro ciascun giorno di venuta in calore.

RISULTATI

Sono emerse differenze significative tra i due gruppi di trattamento ($P < 0,05$) per l'ISE-pt, la cui durata è risultata di 5,6 giorni per le scrofette trattate con Altrenogest e Gn e di 6,3 giorni per il gruppo trattato solamente con Altrenogest. Tale differenza è stata confermata anche nell'analisi della distribuzione dei dati nei due gruppi ($P < 0,05$); l'indice di Kurtosis calcolato ha evidenziato una distribuzione con curva molto più appuntita nel gruppo delle scrofette con doppio trattamento piuttosto che nel gruppo con solo Altrenogest (3,03 vs 0,24), descrivendo la minore variabilità della venuta in estro dopo la somministrazione di gonadotropine (Grafico 1). Infatti, il 57% delle scrofette trattate con entrambi i farmaci ha manifestato il calore il giorno 5 dalla fine del trattamento con Altrenogest, con un complessivo 83% tra il giorno 5 e 6. Tra le scrofette senza la somministrazione di Gn invece, solo il 41% ha manifestato il calore concomitantemente al giorno 6, mentre le restanti si sono distribuite nei giorni precedenti e seguenti (10% il giorno 5; 17% sia il giorno 7 che il giorno 8). Nel confronto tra frequenze percentuali per ciascun giorno di venuta in calore si è evidenziata forte differenza significativa ($P < 0,001$) al giorno 5 (Grafico 2). I risultati non significativi degli altri parametri indagati sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Dati produttivi delle scrofette dei due gruppi di trattamento

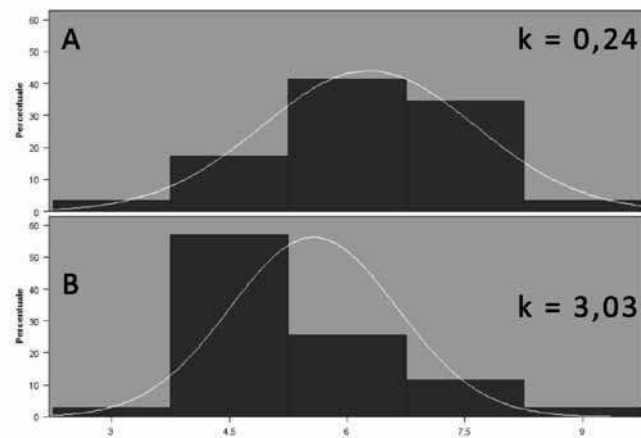
Table 1. Productive data of gilts per treatment group

Variabile	Altrenogest	Altrenogest + Gn	P-value
Scrofette (n°)	30	36	
Calori entro 8 giorni (%)	96,6	97,2	> 0,05
ISE-pt, media (giorni)	6,3 ± 1,4 ^a	5,6 ± 1,1 ^b	< 0,05
Fertilità ecografica %	90	83,3	> 0,05
Portata al parto (%)	83,3	77,8	> 0,05
Nati totali, media (n°)*	14,8 ± 2,7	13,2 ± 3,5	> 0,05
Nati vivi, media (n°)*	12,6 ± 3,1	11,5 ± 4,1	> 0,05
Nati morti, media (n°)*	1,5 ± 2,2	1,0 ± 1,3	> 0,05
Mummificati, media (n°)*	0,7 ± 1,4	0,7 ± 2,3	> 0,05

*Dati calcolati escludendo i parti delle scrofette tornate in calore dopo la fecondazione.

Grafico 1. Analisi della distribuzione degli intervalli tra l'ultima somministrazione di Altrenogest ed il calore.

Graph 1. Distribution analysis of time intervals between the last Altrenogest administration and the heat.



A: scrofette trattate solo con Altrenogest;
B: scrofette trattate sia con Altrenogest che con Gn;
 k = indice di Kurtosis.

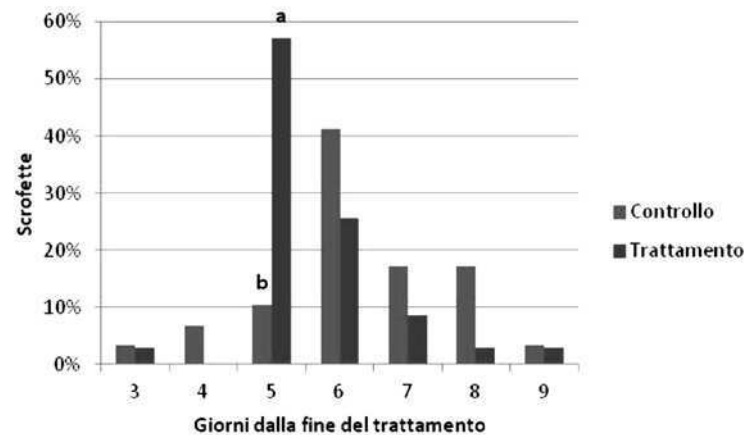


Grafico 2. Frequenze percentuali del giorno di insorgenza dei calori nelle scrofette appartenenti ai due gruppi di trattamento (analisi della distribuzione dei dati: $P < 0,05$).

Graph 2. Percentage frequency of day in which heat was observed in gilts belonging to experimental groups (analysis of the data distribution: $P < 0,05$).

^{a,b}: lettere differenti indicano differenza significativa tra le frequenze nei due gruppi di trattamento ($P < 0,001$).

DISCUSSIONE

Alla luce della ormai consolidata difficoltà di individuare il momento ideale della fecondazione sia nelle scrofe ed ancor più nelle scrofette, il controllo dell'estro è l'unico approccio per avvicinarsi al minore intervallo possibile tra il momento stesso dell'ovulazione e la fecondazione artificiale. A tale scopo, l'efficacia dell'Altrenogest nel sincronizzare l'estro in scrofette puberi è ampiamente documentato (revisioni: 2, 11, 12). Riassumendo i risultati della bibliografia, Estienne et al. (5) descrivono che la sincronizzazione con l'utilizzo di Altrenogest per 18 giorni garantisce l'estro approssimativamente nel 90% delle scrofette trattate. I risultati del presente lavoro hanno superato queste aspettative in entrambi i gruppi di trattamento, raggiungendo entro l'ottavo giorno dall'ultima somministrazione di Altrenogest il 96,6% ed il 97,2% rispettivamente per le scrofette senza gonadotropine e per quelle trattate anche con il Gn. L'elevata percentuale di scrofette in calore entro l'ottavo giorno dalla fine del trattamento conferma dunque l'efficacia dell'Altrenogest nella sincronizzazione dell'estro a prescindere dall'utilizzo di gonadotropine. Come già osservato da de Jong et al. (13) nel suo recentissimo lavoro, le differenze nelle performance zootecniche dei due gruppi possono infatti essere esigue. Tuttavia, a differenza del presente lavoro, l'autore ha utilizzato le sole eCG per la stimolazione dello sviluppo follicolare. Sebbene infatti le gonadotropine corioniche di cavalla siano spesso utilizzate da sole, la loro associazione con le hCG rappresenta uno tra i protocolli di induzione dell'estro più diffusi sia per la sua efficacia nella stimolazione dell'ovulazione (14) che per la minore mortalità embrionale che ne deriva (15). Nel presente lavoro, utilizzando una associazione tra eCG ed hCG, è emersa una differenza significativa ($P < 0,05$) per l'ISE-pt, che nel sopraccitato studio si era manifestata solo con una lieve tendenza senza piena significatività statistica ($P = 0,07$). Le scrofette trattate con il Gn invece hanno manifestato il calore 5,6 giorni dopo la fine del trattamento, rispetto ai 6,3 giorni degli animali trattati solo con Altrenogest. Risultati simili erano stati riportati precedentemente in bibliografia da Horsley et al. (6), anche in questo caso a seguito dell'associazione di hCG e eCG. Ancora, una riduzione dell'ISE-pt nelle scrofette è stata osservata anche da Engl et al. (16) con il GnRH e da Martinat-Botté et al. (17) con le eCG associate ad un agonista del GnRH. Al contrario, Kaeoket (18), che ha utilizzato le sole hCG dopo l'Altrenogest, afferma invece che l'intervallo tra la fine del trattamento e l'estro non sia tra i parametri influenzati dalla somministrazione di gonadotropine. Malgrado i risultati contrastanti, è da sottolineare il differente utilizzo che i diversi autori hanno fatto delle gonadotropine, facendo emergere una apparente minore efficacia per i protocolli che prevedano dopo il progestinico solo una delle gonadotropine in esame (eCG o hCG) e non una associazione tra loro o con GnRH. Sebbene non si possano paragonare i diversi lavori perché condotti in condizioni sperimentali differenti, l'effetto positivo sulla venuta in estro dopo il trattamento riscontrato nel presente lavoro potrebbe essere attribuibile proprio all'associazione di eCG e hCG. È probabile infatti che la riduzione dell'intervallo ISE-pt sia avvenuta grazie alla sinergia nell'attività LH- ed FSH-simile delle due gonadotropine; Driancourt et al. (19) afferma infatti che l'LH stimoli la crescita follicolare dai 4mm fino alle dimensioni preovulatorie, e che questo si traduca in accorciamento della fase follicolare e nella conseguente riduzione dell'ISE-pt (13, 20). Inoltre, l'efficacia del protocollo terapeutico utilizzato conferma anche la correttezza delle tempistiche di somministrazione delle gonadotropine dopo l'ultima dose di Altrenogest (24 ore): Kaeoket (18) infatti, che non aveva registrato alcuna efficacia nel proprio protocollo, suggeriva come il timing da lui utilizzato (3 giorni dopo l'ultima dose di Altrenogest) potesse essere improprio e responsabile di uno squilibrio ormonale che potesse aver portato al mancato aumento preovulatorio di LH, alla precoce produzione di progesterone per luteinizzazione dei follicoli, e a conseguenti interferenze nel processo di ovulazione.

Gli altri parametri rilevati nel presente lavoro non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi di trattamento. Sebbene le stesse conclusioni abbiano suscitato alcune perplessità in altri autori (17) sui reali effetti benefici dell'aggiunta di gonadotropine all'Altrenogest, è utile sottolineare come da un'indagine più approfondita sull'ISE-pt si possano avere risvolti estremamente interessanti per l'ottimizzazione della successiva fase di inseminazione della scrofetta. Infatti l'analisi del parametro ha evidenziato anche una maggiore concentrazione dei calori in due giorni nel gruppo con Gn piuttosto che in quattro. Engl et al. (16) suggeriscono il potenziale tornaconto ottenibile dalla concentrazione delle inseminazioni in un arco di tempo minore. Come suggerito da Degenstein et al. (21), l'ottenimento di calori ravvicinati permetterebbe di focalizzarvi maggiore attenzione zootecnica e valutare con maggior precisione il momento delle ovulazioni, conseguentemente anch'esse più ravvicinate, ottimizzando al massimo il management di questa delicata fase. L'adozione di un protocollo di inseminazione artificiale con scarso margine di errore rappresenta infatti il valore aggiunto dell'efficacia dell'induzione dell'estro; il fine ultimo delle ricerche in questo campo, empiricamente, è l'ulteriore restringimento di questo intervallo per l'utilizzo di una singola dose di seme (21).

In conclusione, la somministrazione di eCG e hCG in associazione 24 ore dopo la fine del trattamento con Altrenogest nelle scrofette, garantisce un migliore intervallo tra quest'ultimo e la venuta in estro degli animali. Il più ristretto range di insorgenza dello stesso consente di ottimizzare il management delle inseminazioni nella scrofetta, facilitando così la delicata gestione di questo animale dal ruolo chiave nell'azienda suinicola moderna.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Davis, D.L., Using Regumate to control estrus in swine, Conference paper of the Swine Day, 2004. <http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/handle/2097/1975/Using%20Regumate%20to%20Control%20Estrus%20in%20Swine-%20Swine%20Day%202004.pdf?sequence=1>
- (2) Gordon, I., Controlled Reproduction in Pigs, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1997.
- (3) Brüssow, K.P., Wähner, M., Biological and technological background of estrus synchronization and fixed-time ovulation induction in the pig, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27, 533-545, 2011.
- (4) Knox, R.V., Tudor, K.W., Rodriguez-Zas, S.L., Robb, J.A., Effect of subcutaneous vs intramuscular administration of P.G. 600 on estrual and ovulatory responses of prepubertal gilts, *Journal of Animal Science*, 78, 1732-1737, 2000.
- (5) Estienne, M.J., Harper, A.F., Horsley, B.R., Estienne, C.E., Knight, J.W., Effects of P.G. 600 on the onset of estrus and ovulation rate in gilts treated with Regumate, *Journal of Animal Science*, 79, 2757-2761, 2001.
- (6) Horsley, B.R., Estienne, M.J., Harper, A.F., Purcell, S.H., Baitis, H.K., Beal, W.E., Knight, J.W., Effect of P.G. 600 on the timing of ovulation in gilts treated with altrenogest, *Journal of Animal Science*, 7, 1690-1695, 2005.
- (7) Consiglio dell'Unione Europea, Consiglio Direttivo 2008/120/EC del 18 dicembre 2008 che stabilisce le norme minime sulla protezione dei suini, *Official Journal* 316, 36-38, 2008.
- (8) Stalder, K.J., Johnson, C., Miller, D.P., Baas, T.J., Berry, N., Christian, A.E., Serenius, T.V., The replacement gilt evaluation guide, National Pork Board, Des Moines, IA USA, 2009.
- (9) Signoret, J.P., Reproductive behavior of pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 11, 105-107, 1970.
- (10) Almeida, F., R.C.L., Novak, S., Foxcroft, G.R., The time of ovulation in relation to estrus duration in gilts, *Theriogenology*, 7, 1389-1396, 2000.
- (11) Webel, S.K., Day, B.N., The control of ovulation, *Control of pig reproduction*, D.J.A. Cole, G.R. Foxcroft, ed. Butterworths, London, UK, 1982.
- (12) Day, B.N., Estrous cycle regulation, *Proceedings of 10° International Congress on Animal reproduction and Artificial Insemination*, Urbana, IL, 1984.
- (13) De Jong, E., Kauffol, J., Engl, S., Jourquin, J., Maes, D., Effect of a GnRH analogue (Mapeelin) on the reproductive performance of gilts and sows, *Theriogenology*, 8, 870-877, 2013.
- (14) Brüssow, K.P., Schneider, F., Tuchscherer, A., Kanitz, W., Influence of synthetic lamprey GnRH-III on gonadotropin release and steroid hormone levels in gilts, *Theriogenology*, 74, 1570-1578, 2010.
- (15) Tilton, J.E., Schmidt, A.E., Weigl, R.M., Ziecik, A.J., Ovarian steroid secretion changes after hCG stimulation in early pregnant pigs, *Theriogenology*, 32, 623-631, 1989.
- (16) Engl, S., Bischoff, R., Zaremba, W., Use of a new GnRH to control reproduction in gilts, *Proceedings of the 21th IPVS Congress*, Vancouver, Canada, P778.
- (17) Martinat-Botté, F., Venturi, E., Guillouet, P., Driancourt, M.A., Terqui, M., Induction and synchronization of ovulations of nulliparous and multiparous sows with an injection of gonadotropin-releasing hormone agonist (Receptal), *Theriogenology*, 73, 332-342, 2010.
- (18) Kaeoket, K., Study on the oestrous synchronization in gilts by using progestin altrenogest and hCG: its effects on the follicular development, ovulation time and subsequent reproductive performance, *Reproduction of domestic animals*, 43, 127-129, 2008.
- (19) Driancourt, M.A., Terqui, M., Follicular growth and maturation in hyperprolific and large white sows, *Journal of animal science*, 74, 2231-2238, 1996.
- (20) Cassar, G., Hormonal control of pig reproduction, *London Swine Conference, Tools of the Trade*, 137-139, 2009.
- (21) Degenstein, K.L., O'Donoghue, R., Patterson, J.L., Beltranena, E., Ambrose, D.J., Foxcroft, G.R., Dyck, M.K., Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effects on reproductive function, *Theriogenology*, 70, 1075-1085, 2008.

**UN EPISODIO DI INTOSSICAZIONE DA IONOFORI
(MADURAMICINA E SALINOMICINA) IN RIPRODUTTORI IN
GRAVIDANZA E LATTAZIONE**

***AN EPISODE OF IONOPHORES (MADURAMICIN AND
SALINOMICYN) TOXICOSIS IN PREGNANT AND LACTATING
BREEDERS.***

POZZI P.¹, BRITZI M.¹, SHIMSHONI J.¹, EDERY N.¹, BOUZNACH A.¹, CUNEAH O.¹,
SOBACK S.¹, BELLAICHE M.¹, JOUNIS A.², BLECH E.¹, OREN P.¹, PERL S.¹

¹The Veterinary Services and Kimron Veterinary Institute, Ministry of Agriculture,
Bet Dagan, Israel. ²Veterinarian, Kibutz Lahav, Israel

Parole chiave: ionofori, gravidanza, lattazione, intossicazione, miocardio, CPK

Key words: ionophores, pregnancy, lactation, toxicosis, myocardium, CPK

Riassunto: Tra Marzo ed Aprile 2013, in un'azienda di 1150 scrofe, si sono verificati due distinti episodi di elevata mortalità che hanno coinvolto 98 scrofe in lattazione su 180 (mortalità 54,4%) e 17 tra scrofette e scrofe gravide e due verretti, su 26 soggetti in totale (mortalità 65%). Le scrofe in lattazione erano state alimentate per 8 giorni con 3 lotti differenti di mangime da lattazione. Le scrofette e scrofe gravide ed i verretti erano stati alimentati per 5 giorni con un lotto di mangime da gravidanza. I segni clinici includevano parziale rifiuto del mangime (fase finale di intossicazione), anoressia, stress respiratorio, letargia, atassia, decubito, mortalità improvvisa. I 3 lotti di mangime da lattazione rivelavano livelli di maduramicina e salinomicina tra i 7-25 ed i 2-42 mg/kg rispettivamente. Il lotto di mangime da gravidanza rivelava maduramicina tra i 17 ed i 20 mg/kg. Una fonte non intenzionale di ionofori nei mangimi animali può essere rappresentata da contaminazione crociata nel passaggio tra una produzione di mangime ad un'altra o erronea incorporazione in mangime per animali non destinati al trattamento. Gli animali sono vulnerabili ai possibili danni da ionofori a causa della loro bassa soglia di sicurezza. Gli organi più vulnerabili a danni da ionofori sono rappresentati da cuore e muscolo scheletrico in tutte le specie studiate. Le segnalazioni di intossicazioni da ionofori nel suino sono scarse in comparazione a quelle nel pollo e nel bovino.

Abstract: March to April, 2013, in two different episodes, two high mortality cases occurred in a 1150 sows unit, affecting 98 lactating sows out of 180 (54,4% mortality) and a group of 17 pregnant gilts, sows and 2 boars out of 26 (65% mortality). The sows were fed with 3 different batches of a "lactation" feed over 8 days. The pregnant gilts, sows and boars were fed with 1 batch of a "pregnancy" feed over 5 days. Observed clinical signs included partial feed refusal (final stage of intoxication), anorexia, respiratory distress, lethargy, ataxia, recumbency, sudden death. The 3 "lactation" feed batches, revealed maduramicin and salinomycin levels between 7-25 and 2-42 mg/kg respectively. The "pregnancy" feed revealed maduramicin levels between 17-20 mg/kg. Unintentional sources of ionophores in animal feed may result from cross-contamination from one feed production to another or incorporation into non-target animal feed. Animal becomes vulnerable towards toxic effects of ionophores, due to their low safety margin. The most vulnerable organs susceptible to ionophores injury are the heart and skeletal muscles in all species studied. Reports on ionophores toxicosis in pigs are scarce compared to poultry and cattle.

INTRODUZIONE

Gli Ionofori, polieterei carbossilici, sono largamente utilizzati su scala mondiale per il controllo delle coccidiosi e come promotori di crescita negli animali d'allevamento (1). Contrariamente all'Unione Europea in cui gli Ionofori sono autorizzati esclusivamente nel pollo (ad esclusione della salinomicina anche usata nel coniglio), negli Stati Uniti gli Ionofori lasalocid, laidlomocina, monensin e semduramicina sono anche approvati per l'uso nei bovini da carne quali miglioratori dell'efficienza alimentare e della crescita (1). In Israele alcuni Ionofori sono autorizzati all'uso nei polli (maduramicina, salinomicina, monensin, lasalocid, narasin), nei tacchini (maduramicina, monensin, lasalocid), nei bovini (monensin, lasalocid) e negli ovini (lasalocid) (2). Il bersaglio principale degli Ionofori, ai dosaggi raccomandati, e' rappresentato da parassiti protozoari, tuttavia a piu' elevati dosaggi l'animale, alimentato con mangimi medicati, diviene altamente vulnerabile nei confronti di diversi effetti collaterali degli Ionofori sulla muscolatura del cuore e dei muscoli scheletrici (3,4,5,6,7,8). Cio' e' dovuto allo stretto margine di sicurezza di alcuni Ionofori in alcune specie animali (1). In letteratura sono scarsi i rapporti di intossicazione da ionofori nel suino (9, 10). Questo lavoro descrive un doppio episodio di intossicazione da Ionofori in due gruppi distinti di riproduttori in un'azienda a ciclo chiuso di 1150 scrofe, localizzata nel Sud di Israele.

MATERIALI E METODI

Descrizione dell'azienda: trattasi di un'azienda a ciclo chiuso di 1150 scrofe, localizzata nella Regione Sud di Israele, a 19 km in direzione nord-est da Beer Sheva, capoluogo della Regione. L'azienda e' provvista di un proprio macello e nel 2013 ha prodotto circa 24,300 capi, con peso medio vivo alla macellazione di circa 90-95 kg. Integrato all'azienda e' un Centro di Ricerche Pre-Cliniche (*Lahav C.R.O.*) che utilizza il suino quale modello sperimentale in test farmacologici, chirurgici, endocrinologici, xenotrapianti (apparato circolatorio), nonche' "banca della pelle" per "grandi ustionati". L'azienda e' sierologicamente negativa (95% confidenza, 5% prevalenza; 0 campioni positivi) a Malattia d'Aujeszky (AD), Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRS), *Leptospira spp.* (8 sierovarianti); positiva al Tipo A di Influenza Suina (SI) ma sierologicamente negativa (95% confidenza, 5% prevalenza; 0 campioni positivi) ai sottotipi influenzali H1N1, H1N2, H3N2; Quanto sopra, sulla base di test routinariamente effettuati presso la Sezione Diagnostica di Brescia dello Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia -Emilia Romagna (IZS-LER). L'azienda e' inoltre clinicamente ed anatomo-patologicamente negativa a Rinite Atrofica (RA). Antecedentemente la prima inseminazione artificiale, i giovani riproduttori sono sottoposti ad un piano vaccinale verso Parvovirus Suino (PPV), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (MR), *Escherichia coli* (E coli), e ad un richiamo vaccinale verso Circovirus Suino (PCV2) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo). Le scrofe subiscono ulteriori richiami vaccinali: verso E coli; M hyo; PCV2 prima del parto; MR, PPV durante la lattazione. I verri sono richiamati due volte l'anno verso MR, PPV, M hyo, PCV2. L'azienda e' totalmente dipendente per quanto riguarda l'approvvigionamento di mangime: dall'estero (Italia, Francia, Belgio) per il mangime finito per suinetti; da due o piu' mangimifici locali per la fornitura di mangime finito per tutte le altre categorie di suini.

Descrizione dell'evento clinico: Dal primo Marzo 2013, 180 scrofe in sala parto avevano ricevuto 3 differenti lotti di un medesimo mangime da lattazione, prodotto da un locale mangimificio. L'8 Marzo, 8 scrofe furono trovate morte senza apprezzabili precedenti clinici; altre scrofe evidenziavano difficoltà respiratoria, atassia, decubito laterale. L'indomani altre

5 scrofe venivano trovate morte e in 20 giorni la mortalità raggiungeva 98 soggetti sui 180 presenti (54%). I suinetti non mostravano alcun segno clinico particolare durante queste tre settimane. Al ricevimento dei primi risultati delle analisi effettuate sul mangime, questo veniva sospeso e cambiato con una nuova produzione. Per ulteriori 70 soggetti, in ogni caso, la situazione clinica non migliorava e, su indicazione dei Servizi Veterinari, venivano inoltrati al macello, annesso all'azienda, per eutanasia e distruzione.

Immediatamente in seguito al descritto episodio, il 9 Aprile 2013, in un gruppo di 22 scrofette e 2 scrofe gravide al primo mese di gestazione, e due verretti di circa un anno, 10 scrofette ed i due verretti vennero trovati morti senza apprezzabili precedenti clinici. All'indomani ulteriori 5 scrofette venivano trovate morte (totale mortalità 65%), mentre nei rimanenti soggetti si apprezzavano segni clinici riferibili a stress respiratorio, difficoltà alla deambulazione, decubito laterale, rifiuto del mangime. Sulla base del precedente episodio in sala parto, anche in questo caso il mangime veniva immediatamente sostituito ed inviato al laboratorio per analisi. In seguito al cambio di mangime, mentre la situazione delle due scrofe migliorava (e queste arrivavano al parto senza ulteriori segni clinici particolari) la situazione di di altre 7 scrofette deteriorava nei 3-4 giorni successive, ed anche queste venivano inoltrate al macello per eutanasia e scarto.

I dati complessivi relativi a incidenza clinica, mortalità ed eutanasia sono riassunti in Tabella 1.

Tabella 1: episodi, categorie dei soggetti coinvolti, mortalità ed eutanasie tra i soggetti coinvolti.

Table 1: episodes, categories of involved animals, mortality and euthanized animals.

Episodio	Categoria	Soggetti coinvolti	Mortalità				Eutanasia		Totale perdite
			Improvvisa	Successiva	Totale	Percentuale	Numero	Percentuale	
Marzo 2013	Scrofe, sala parto	180	8	90	98	54%	70	39%	93%
Aprile 2013	Scrofette e scrofe gravide; 2 verretti	26	12	5	17	65%	7	27%	92%

Indagini di laboratorio:

Mangime: in occasione di entrambi gli episodi, venivano raccolti campioni di mangime da tutti i lotti utilizzati sia in sala parto che in gestazione ed inviati al Kimron Laboratory Institute, Servizi Veterinari e Sanità Animale, Ministero dell'Agricoltura e Sviluppo Rurale, Bet Dagan, Israele. I mangimi venivano sottoposti ad analisi relativamente alla presenza di:

- antibiotici (doxiciclina, clortetraciclina, ossitettraciclina) e Ionofori (monensin, lasalocid, maduramicina, semduramicina, narasin) tramite cromatografia liquida e spettrometria di massa. L'analisi relativa agli Ionofori veniva suggerita dalla cronologia delle produzioni di mangime antecedenti le forniture all'azienda, le quali evidenziavano immediatamente precedenti produzioni di mangimi per polli e tacchini addizionati, appunto, di Ionofori.

- elementi e metalli (As, Cd, Co, Zn, Cu, Fe, Pb, Mn, Hg, Mo, Se, Tl), tramite esame spettroscopico

- pesticidi (organofosfati, carbammati, piretroidi, organocloridati) tramite gas cromatografia e spettrometria di massa.

Campioni biologici: durante i due episodi venivano prelevati in totale 12 campioni di sangue, da 12 soggetti: il sangue intero veniva testato per conta eritrocitaria (RBC), volume corpuscolare (CPV), concentrazione di emoglobina (Hb), conta leucocitaria (WBC) e formula leucocitaria. I sieri di sangue venivano testati relativamente agli enzimi Creatina Fosfo Kinasi (CPK), Alanina Amino Transferasi (ALT), Alcalino Fosfatasi (ALP), Aspartato Amino Transferasi (AST), oltre che per la concentrazione di Creatinina ed Urea. Venivano effettuate 7 necroscopie e prelevati campioni d'organo (cuore, fegato, muscolo scheletrico, polmone, rene, milza, intestino, cervello). Campioni di polmone, fegato, milza e rene venivano sottoposti ad esame microbiologico e virologico; cuore e muscolo scheletrico (da diverse sezioni anatomiche) ad esame istopatologico. Campioni di fegato ad esame tossicologico per la presenza di ionofori tramite cromatografia liquida-spettrometria di massa.

RISULTATI

Clinica; anatomopatologia: Durante entrambi gli eventi clinici, la temperatura corporea media dei soggetti in vita si e' rivelata normale (38,2 – 38,4°C). I segni clinici includevano parziale rifiuto del mangime (fase finale di intossicazione), anoressia, stress respiratorio, letargia, atassia, decubito o posizione a "cane seduto", tremori muscolari intensi del treno posteriore. L'esame necroscopico, sia in azienda che presso il Laboratorio non rivelava lesioni macroscopicamente apprezzabili. Alcuni reni apparivano mediamente congesti, ma ritenevano la normale architettura senza apparenti anomalie.

Ematologia: Relativamente a RBC, WBC, CPV, hB non si sono evidenziate deviazioni da valori medi di riferimento (11) ed i risultati sono riassunti in Tabella 2.

Tabella 2: risultati dell' esame ematologico

Table 2: results from hematologic examination.

Parametro	Media (Range) unita' di mis.
WBC	20.6 (11.3-22.8) (x10.e3/µl)
RBC	5.9 (5.9-8.8) (x10.e6/µl)
HGB	11.8 (10.1-15.1) g/dL
HCT	29.3 (31.3-45.9) %
MCV	49.7 (44.2-60.9) fL
MCH	19.5 (14.4-20.1) pg
MCHC	39.3 (30.6-34.9) g/dL
CHCM	38.5 (30.3-34.2) g/dL
CH	18.1 (14.4-20.1) pg
RDW	20.5 (14.8-19.8) %
Calcio	9.2 (8.1-10.5) mg/dL
Potassio	17.7 (5.5-25) mmol/L
Sodio	120.3 (100.1-140.3) mmol/L
Fosforo	34.7 (14.2-45.2) mg/dL

Relativamente a CPK, ALT, ALP, Creatinina ed Urea, alcuni valori hanno evidenziato differenze statisticamente significative (p<0,05) rispetto a livelli ematici fisiologici medi (Tabella 2).

Tabella 2: risultati degli esami enzimatici e comparazione con valori fisiologici.
Table 2: results from enzymatic examination and comparison with physiological levels.

Marker	Livelli ematici fisiologici medi ¹	Livelli ematici nell'evento clinico ± SE ²
biochimico	(range)	(range)
CPK	47 U/L (0-130)	86348.17 ± 19933.2 U/L* (1890-215315)
ALT	45 U/L (15-52)	292.2 ± 76.8 U/L* (25-1018)
ALP	65 U/L (20-70)	82.0 ± 8.5 U/L (28-140)
Creatinina	0.4-1.2 mg/dL	2.0 ± 0.2 mg/dL (1.4-3.3)
Urea	15-30 mg/dL	35.4 ± 1.9 mg/dL (23-48)

¹ valori d'archivio, Centro Ricerche Pre-Cliniche Lahav, dati non pubblicati

² SE: errore standard

* differenza statisticamente significativa (student t-test) (p<0.05) rispetto a livelli fisiologici

Istopatologia: in preparati conservati in formalina 10% e sezionati a 5µm di spessore, il muscolo scheletrico evidenziava variazioni nella sezione delle miofibre; pronunciate alterazioni degenerative delle miofibre, con rigonfiamento, vacuoli citoplasmatici, ipereosinofilia. Altre miofibre evidenziavano frammentazione, ipereosinofilia, perdita della struttura striata, necrosi (rabdomiolisi), frammentazione e formazione di zone retratte (Figura 1). Il muscolo miocardico evidenziava diffuso pallore del muscolo atriale, presenza di miofibre necrotiche (soprattutto nel miocardio ventricolare sinistro e setto interventricolare), eosinofilia, infiltrazione macrofagitaria e necrosi miocitaria (Figura 2). Non si sono osservate mineralizzazione o infiltrati infiammatori.

Figura 1: muscolo scheletrico: necrosi delle miofibre; sezioni trasversali e longitudinali .
Picture 1: skeletal muscle: miofibers necrosis; longitudinal and cross sections

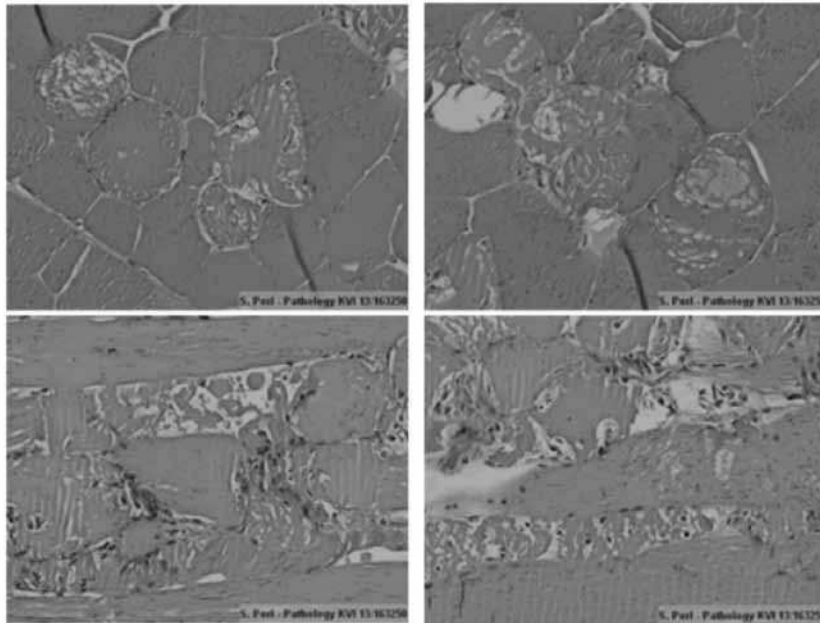
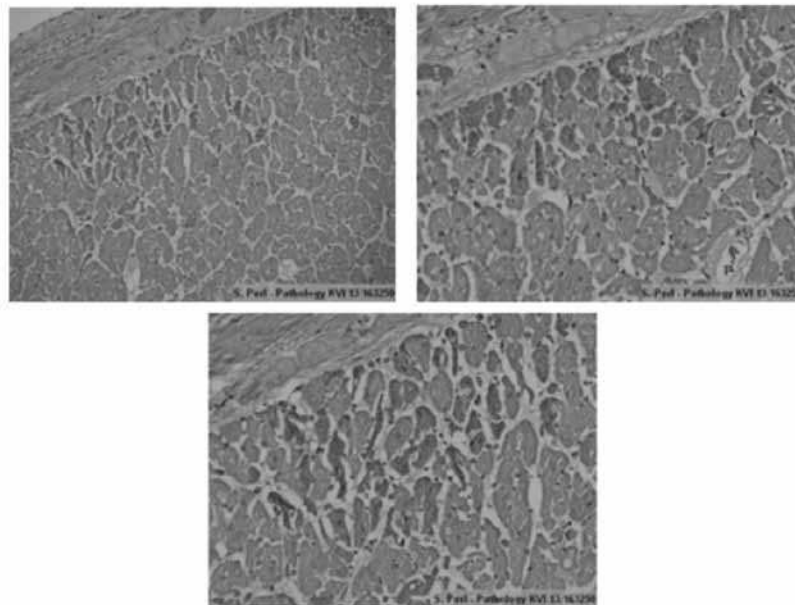


Figura 2: cuore: necrosi multifocali delle miofibre.
Picture 2: hearth: multifocal miofibers necrosis.



Batteriologia e virologia: campioni di polmone, fegato, milza e rene da 7 soggetti non hanno evidenziato presenza di organismi patogeni con rilevanza epidemiologica.

Tossicologia: i campioni di fegato di tutti 7 i soggetti esaminati hanno evidenziato livelli medi di maduramicina pari a 0,5 mg/kg (range 0,05 – 1,15 mg/kg); 1 campione ha evidenziato tracce di lasalocid a 2 µg/kg. I campioni sono inoltre risultati negativi a sulfamidici.

Analisi dei mangimi: i campioni dei 3 lotti di mangime destinati alle scrofe in sala parto hanno evidenziato elevati livelli di maduramicina (7-25,2 mg/kg) e di salinomicina (2-42,1 mg/kg), oltre a livelli elevati di monensin (14,3 mg/kg) in uno solo dei 3 lotti. Il lotto di mangime destinato alle scrofette e scrofe in gravidanza e verretti, ha evidenziato elevati livelli di maduramicina (17 - 20 mg/kg) (sono stati effettuati prelievi di mangime da punti diversi da silos e mangiatoie; cio' puo' spiegare le lievi differenze di concentrazione all'analisi), e livelli minori e non significativi clinicamente di salinomicina (3,0 mg/kg) (Tabella 3). Doxyciclina, clortetraciclina ed ossitetraciclina sono risultati al di sotto dei limiti di rilevamento (0,2 – 0,3 mg/kg) in tutti i lotti esaminati. Gli elementi e metalli esaminati sono risultati in linea con valori normali di riferimento (12)

Tabella 3: concentrazioni di Ionofori rilevate nei diversi lotti di mangime in comparazione con i livelli massimi di concentrazioni tollerabili in corso di contaminazione crociata in mangimi destinati a specie animali non target – non destinate al trattamento, secondo le indicazioni EFSA.

Table3: Ionophores concentrations detected in the different feed batches compared with highest tolerable level as result of cross-contamination in feed for not target animals – animals not destined to treatment, according to EFSA.

Lotto	Categoria	Sostanza rilevata	Concentrazione	Contaminazioni crociate
				massime tollerabili (EFSA, 2008)
1	Scrofe, sala parto	Maduramicina	7 mg/kg	0,5 mg/kg
		Salinomicina	2 mg/kg	
2		Salinomicina	42,1 mg/kg	7 mg/kg
		Maduramicina	25,2 mg/kg	0,5 mg/kg
3		Salinomicina	6 mg/kg	5 - 6,25 mg/kg
		Monensin	14,3 mg/kg	
		Maduramicina	17 - 20 mg/kg	
1	Scrofette e scrofe gravide, 2 verretti	Maduramicina	17 - 20 mg/kg	0,5 mg/kg
		Salinomicina	3,0 mg/kg	

DISCUSSIONE

Esistono pochi report in letteratura sulle intossicazioni da Ionofori nel suino e nei mammiferi in generale, cio' in considerazione del fatto che gli Ionofori sono prevalentemente autorizzati all'uso nei volatili, per cui eventuali casi di intossicazione possono essere il risultato di contaminazione crociata in sede di produzione del mangime o erranea incorporazione (9). L'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha pubblicato diverse Opinioni Scientifiche (3,4,5,6,7,8) in merito ai livelli massimi tollerabili di Ionofori derivanti da contaminazioni crociate (*cross contamination*) in mangimi destinati a specie animali "non target" – ovvero "non destinati" al trattamento con gli Ionofori in oggetto. Tali contaminazioni avvengono perlopiu' nel passaggio tra diverse produzioni di mangime destinate a specie diverse. Sia pure con lievi differenze tra molecola e molecola,

tali massimi livelli tollerabili sono quantificabili al 5% o 10% della dose terapeutica nella specie “target” (volatili, in genere). Tale quantificazione e’ calcolata in base alla “massima dose giornaliera” assumibile dalla specie “non target” e “senza effetti avversi osservabili”. La Tabella 4 riassume: le dosi massime terapeutiche (nelle specie target) dei due Ionofori coinvolti principalmente nel caso di intossicazione descritta, Maduramicina e Salinomicina; la massima dose assumibile, in mg/kg di peso vivo in seguito ad assunzione da contaminazione crociata; la massima dose senza effetti avversi osservabili (NOAEL) cosi’ come indicate dall’EFSA; i livelli effettivamente assunti durante l’episodio clinico.

Tabella 4: dosi massime terapeutiche di Maduramicina e Salinomicina nelle specie target; massima contaminazione crociata tollerabile; massima dose assumibile in seguito a contaminazione crociata; massima dose senza effetti avversi osservabili (NOAEL); livelli effettivamente assunti durante l’episodio clinico.

Table 4: maximal therapeutic dosage of maduramicin and salinomycin in target species; maximal tolerable cross-contamination; maximal assumable dosage in course of cross-contamination; maximal dosage with non observable adverse effects level (NOAEL); actual dosages during the clinical episodes

Ionoforo	Dosaggi nel mangime, mg/kg:		Assunzioni giornaliere, mg/kg/peso vivo:		
	terapeutici per specie bersaglio	contaminazione tollerata	in corso di contaminazione tollerata	NOAEL ¹	nel caso clinico e per categoria
Maduramicina	5	0.5	0.025		
scrofe sala parto				0.16	0.20 - 0.73
scrofette, scrofe gravide verretti					0.37 - 0.44
Salinomicina	< 70	7	0.35		
scrofe sala parto				0.5	1.22
scrofette, scrofe gravide verretti					0.07

¹ NOAEL : non observable adverse effects level - livello senza effetti avversi osservabili

Relativamente alla maduramicina nel suino, l’EFSA riporta livelli di 5mg/kg nel mangime senza effetti collaterali (8) mentre richiama l’episodio di intossicazione di massa avvenuto nel 1991 (9) con dosaggi di 37,5mg/kg. L’episodio di intossicazione qui descritto e’ stato causato da dosaggi intermedi, rispetto a quelli citati (17 – 25,2 mg/kg) ma con sintomatologia clinica, lesioni istopatologiche ed alterazione dei profili enzimatici ematici sovrapponibili a (9) e descritti dall’EFSA (8). In questo episodio la massima dose assunta si e’ rivelata superiore tra le 2,75 volte (nel gruppo scrofette, scrofe gravide e verretti) ed 1,25 volte (nel gruppo scrofe in sala parto) rispetto al NOAEL indicato dall’EFSA.

Relativamente alla salinomicina nel suino, l’EFSA riporta livelli sino a 137 mg/kg nel mangime (5 mg/kg/peso vivo); inoltre cita livelli di 60 mg/kg nel mangime per scrofe in gravidanza (pari a circa 1,16 - 1,0 mg/kg/peso vivo, assumendo una ingestione giornaliera di 3,5 kg) senza effetti indesiderati (5). Nell’episodio di intossicazione qui descritto i livelli di salinomicina massimi riscontrati sono stati di 42,1 mg/kg nel mangime da sala parto, e quindi corrispondenti ad un’assunzione giornaliera sino a circa 1,15 – 1,22 mg/kg peso vivo (assumendo una ingestione giornaliera di 6 – 6,5 kg). Tale livello sembrerebbe nettamente inferiore a quelli riportati da EFSA (5) ma non puo’ essere sottovalutata la contemporanea presenza di diversi contaminanti Ionofori nei diversi lotti, il probabile

mescolamento in rapida successione tra diversi lotti e con diversi contaminanti e quindi, in sintesi, un probabile effetto sommatorio: il lotto 3 di mangime da sala parto presentava una concentrazione totale di Ionofori pari a 45,5 mg/kg, di cui perlomeno due (maduramicina e monensin) (8,6) a stretto margine di sicurezza. Anche in questo caso le lesioni istopatologiche riscontrate nell’episodio clinico descritto sono in linea con quelle riportate in letteratura (5,6), ad esclusione delle lesioni renali ed epatiche riportate da (10) probabilmente legate all’effetto potenziatore da tiamulina (13) che e’ mancato nel caso descritto.

Benessere animale: le scrofe in sala parto e le scrofette che non mostravano segni di remissione clinica sono state inviate all’annesso macello, sottoposte a stordimento elettrico e jugulazione. Cio’ in linea con le vigenti disposizioni sull’allevamento dei suini (14). Retrospectivamente la correttezza della decisione e’ stata confermata dai riscontri istopatologici in sede muscolare e, in particolare, cardiaca.

Conclusioni

In letteratura non sono frequenti i report di intossicazione da Ionofori nei mammiferi in generale e nel suino in particolare. Questo e’ il primo riscontro di intossicazione da Ionofori nel suino in Israele. La totale dipendenza degli allevatori locali da mangimifici (mancano i mangimifici “aziendali”) puo’ porre il suino ed altri mammiferi (bovini, piccoli ruminanti) a rischio intossicazione da Ionofori quale risultato di cross-contaminazioni a livelli elevati od erronea incorporazione nel mangime. Tale livello di rischio e’ relativamente elevato in un Paese quale Israele ad elevatissima produzione di pollo e tacchino (oltre 260 milioni di capi macellati nel 2012) con quindi predominante produzione di mangime dedicato. La locale Legislazione, relativamente agli Ionofori, ed altri possibili contaminanti, si rapporta a livelli massimi da contaminazione crociata per animali target e non target, in linea con i valori EFSA (15).

BIBLIOGRAFIA

1. Dorne J., Fernández-Cruz, M., Bertelsen, U., Renshaw D., Peltonen K., Anadon A., Feil A., Sanders P., Wester P., Fink-Gremmels J., (2013) “Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects.” Toxicol. App. Pharmacol. 270, 196-208.
2. Israel Drug Registry (2013), www.old.health.gov.il/units/pharmacy/trufot/index
3. EFSA (European Food Safety Authority), (2007) “Cross-contamination of non-target feeding stuffs by narasin authorised for use as a feed additive.” Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain”. EFSA J. 552, 1–35.
4. EFSA (European Food Safety Authority), (2007) “Cross-contamination of non-target feeding stuffs by lasalocid authorised for use as a feed additive.” Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 553, 1–46.
5. EFSA (European Food Safety Authority), (2008) “Cross-contamination of non-target feeding stuffs by salinomycin authorised for use as a feed additive”. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 591, 1–38.
6. EFSA (European Food Safety Authority), (2008) “Cross-contamination of non-target feeding stuffs by monensin authorised for use as a feed additive.” Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 592, 1–40.
7. EFSA (European Food Safety Authority), (2008) “Cross-contamination of non-target feeding stuffs by semduramicin authorised for use as a feed additive.” Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 593, 1–27.

8. EFSA (European Food Safety Authority), (2008) "Cross-contamination of non-target feeding stuffs by maduramicin authorised for use as a feed additive." Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 594, 1–30.
9. Sanford, S., McNaughton, C., (1991) "Ionophore (maduramicin) toxicity in pigs." Can. Vet. J. 32, 567.
10. Pecorelli, I., Manuali, E., Sensi, M., Mazzone, P., Moscati, L., (2003) "Intossicazione da salinomicina e tiamulina in un allevamento di suini all'ingrasso: reperti istopatologici", Atti XXIX SIPAS, 303-308, Salsomaggiore Terme (PR)
11. Loynachan A., (2012) "Cardiovascular and hematopoietic systems" in Zimmerman J., Karriker L., Ramirez A., Schwartz K., Stevenson G., "Diseases of swine" 10th Ediz., Wiley Blackwell, 189-198, IOWA, USA
12. Puls R., (1994) "Mineral levels in animal health: diagnostic data", 2nd ed., 83, 135, 283. Sherpa International, Aldergrove, British Columbia, Canada
13. Van Vleet J., Runnels L., Cook J.Jr, Scheidt A., (1987) "Monensin toxicosis in swine: potentiation by tiamulin administration and ameliorative effect of treatment with selenium and/or vitamin E." Am. Journal Vet. Res., 48(10):1520-24
14. Guidelines for Swine Keeping (2012), www.vetserveng.moag.gov.il
15. Animal Feed Inspection Division requirements for issue/renewal of permit to manufacture, market and trade in animal feed products, based on the Israeli Commodity and Services Control Order (Production and Trade of Feed), 5731 – 1971 ("Feed Order") (2014), www.vetserv.moag.gov.il

VALUTAZIONE DELL'INFLUENZA DEI FATTORI DI RISCHIO LEGATI AL MANAGEMENT E ALLA STRUTTURA AZIENDALE SULLA PREVALENZA DELL'ASCARIDIOSI SUINA IN PIEMONTE

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF RISK FACTORS RELATED TO FARM MANAGEMENT AND STRUCTURE ON ASCARIASIS PREVALENCE: THE PIEDMONTESE CONTEXT

RAMBOZZI L.¹, MASSAGLIA S.², MERLINO V.², BORRA D.², BOSCHETTI G.³

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino;

²Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino;

³Servizio Veterinario ASL TOX

Parole chiave: *Ascaris suum*, epatite parassitaria, fattori di rischio

Key words: *Ascaris suum*, hepatic milk spots, risk factors

Riassunto: L'ascaridiosi è una parassitosi che condiziona più o meno indirettamente l'efficienza e la produttività delle aziende suinicole a livello mondiale. La ricerca ha previsto l'individuazione di fattori di rischio, legati alle caratteristiche strutturali e al management aziendale, associati alla presenza di "milk spot lesions" al macello. Dallo studio dei registri di macellazione dello stabilimento "Aimaretti spa", sono state selezionate 24 aziende suinicole piemontesi in base al numero di sequestri per epatite parassitaria. Dall'analisi statistica emerge come l'ascaridiosi risulta essere ancora estremamente diffusa (23,1% nel 2011, 19,9% nel 2012), con prevalenze sostanzialmente sovrapponibili a quelle del 2005 (20,1%). I fattori di rischio quali, la pratica di "tutto pieno/tutto vuoto", la disinfezione a fine ciclo, nonché l'utilizzo di antiparassitari non risultano significativi sulla riduzione della prevalenza di *Ascaris suum* in azienda. Al contrario, esiste una correlazione positiva statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra la pavimentazione piena o mista, il lavaggio con acqua fredda a fine ciclo produttivo, l'alimentazione con mangime e la positività per ascaridi. In conclusione, un sistema efficace per l'eradicazione dell'ascaridiosi deve prevedere un bilancio tra le potenziali perdite produttive legate alla patologia ed i costi previsti derivanti dall'attuazione di un sistema di profilassi completo che includa, oltre che un trattamento farmacologico mirato, anche adattamenti strutturali e della gestione aziendale.

Abstract: The Ascariasis is a parasitic disease that directly and/or indirectly affects pig farms efficiency and productivity all over the world. The research involved the identification of risk factors, related to farm structural characteristics and management, associated with "milk spot lesions" presence at abattoir due to *Ascaris suum* larval migration in the pig liver. 24 piedmont pig farms were selected in using the slaughterhouse register, in which seizures for hepatitis parasitic are recorded.

Statistical analysis shows how the Ascariasis is even now extremely widespread (23,1% in 2011, 19,9% in 2012 %), with prevalence substantially comparable to those of 2005 (20,1 %). Risk factors such as the "all in/all out" practice, the disinfection at the end of the production cycle and the pharmacological treatment are not significant for *Ascaris suum* prevalence reduction in the farms. On the contrary, positive significant correlation ($p < 0,05$) emerges between the fully or partially grinded floor, the washing with cold water

at the end of the production cycle, the dry feed and the positivity for *Ascaris suum*. In conclusion, an effective system for ascariasis eradication must provide a balance between the potential production losses related to the pathology and the expected costs resulting from the implementation of a complete prophylaxis system that includes, as well as a targeted pharmacological treatment, even structural and management farm characteristics.

INTRODUZIONE

L'ascaridiosi è una delle più diffuse parassitosi del suino e rappresenta ancora oggi un fattore limitante per le produzioni zootecniche in grado di incidere negativamente sulla redditività dell'azienda. L'elevata diffusione del parassita è dovuta a molteplici fattori: 1) l'elevata prolificità delle femmine di ascaride, 2) l'escrezione di uova caratterizzate da un'altissima resistenza ambientale, anche in condizioni di carenza idrica e di basse temperature, che ne consentono la sopravvivenza per molti mesi o addirittura anni, 3) la presenza di un microclima particolarmente favorevole allo sviluppo delle larve all'interno dell'allevamento intensivo.

Le forme larvali compiono nel suino una migrazione macrosplancica entero-epato-cardio-pneumo-enterica; al passaggio della larva consegue una reazione di tipo fibroso-cicatriziale e la classica epatite parassitaria multipla caratterizzata da focolai infiammatori biancastri che esitano in reazioni connettivali ("milk spot lesions"). Queste caratteristiche lesioni sono apprezzabili ad occhio nudo, durante l'ispezione sanitaria ed in sede di macellazione comportano l'esclusione dal consumo umano del fegato.

La sopravvivenza di *Ascaris suum* è fortemente condizionata da una corretta gestione igienicosanitaria degli impianti zootecnici; nonostante le imponenti trasformazioni del settore a livello strutturale e gestionale (sale parto, gabbie di svezzamento, acciaio inossidabile, climatizzazione, idropultrici, potenti principi attivi antielmintici...), la prevalenza di *Ascaris suum* resta sostanzialmente invariata.

Le infestazioni da *A.suum* e più specificamente le sue fasi di migrazione larvale hanno dimostrato avere un significativo impatto negativo sulla redditività dell'allevamento suino (Kipper et al., 2011; Van Meensel et al., 2010).

Indagini condotte in Italia a partire dagli anni '40 rivelano prevalenze parassitarie che, negli anni, rimangono fondamentalmente immutate, (Baldelli, 1949; Restani, 1969; Tassi e Widenhorn, 1972; Baldelli et al., 1974; Poglayen e Martini, 1985; Rambozzi et al., 2006). In Piemonte, negli ultimi 10 anni, il numero di fegati sequestrati alla macellazione per epatite parassitaria è sempre risultato superiore al 20%, con un picco di quasi il 35%.

L'obiettivo di questo lavoro è individuare i fattori legati alla struttura ed al *management* aziendale maggiormente associati alla presenza di *Ascaris suum* in aziende suinicole piemontesi e, in particolar modo, alla prevalenza di "milk spots" alla macellazione.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta presso lo stabilimento di macellazione "Aimaretti spa", situato a Villafranca Piemonte (TO). La capacità produttiva dello stabilimento è di circa 220.000 capi (circa 800 tonnellate) all'anno, più del 30% dei capi macellati in Piemonte.

Raccolta dei dati

Per la raccolta dei dati sono stati utilizzati i registri di macellazione relativi all'ispezione *post mortem* (Banca Dati Regionale - Infomacelli) di tutte le macellazioni effettuate da Gennaio 2011 a Dicembre 2012. Per ogni lotto di suini sono stati riportati: a) il codice identificativo aziendale; b) la consistenza numerica dell'allevamento; c) la consistenza numerica del lotto portato a macellazione; d) il numero di sequestri ispettivi per epatite parassitaria.

Sulla base dei dati disponibili precedentemente raccolti nello stesso stabilimento di macellazione (Rambozzi et al, 2006), sono state identificate tutte le aziende che hanno riferito allo stabilimento di macellazione un numero maggiore di 2000 capi negli Anni 2005 – 2006 – 2007 – 2011 – 2012.

Sul numero di sequestri ispettivi per epatite parassitaria gli allevamenti sono stati suddivisi in quattro classi di positività, utilizzando come riferimenti la mediana, il I ed il III quartile. L'analisi delle variabili prese in considerazione come fattori di rischio a livello aziendale è stata effettuata mediante la somministrazione di un questionario in 24 aziende selezionate, di cui 12 con valori al di sotto della mediana (e appartenenti possibilmente al primo quartile) e 12 con valori al di sopra della mediana (e appartenenti possibilmente al quarto quartile). Sono stati registrati i dati relativi alla tipologia produttiva, alle caratteristiche strutturali dell'azienda, ad eventuali trattamenti profilattici /terapeutici antiparassitari utilizzati e pratiche di disinfezione ambientale. In particolare sono stati considerati: l'anno di costruzione e/o ristrutturazione (costruzioni e/o interventi ristrutturativi fatti anteriormente ai 10 anni), il tipo di pavimentazione presente nei box degli ingrassi (grigliata, piena, mista), la modalità di distribuzione della razione (a pavimento, con truogolo, con entrambi), presenza di truogolo corto o lungo, il tipo di alimentazione (mangime secco, alimentazione liquida, mista) l'impiego del tutto pieno-tutto vuoto, il lavaggio a fine ciclo, la disinfezione a fine ciclo, gli antiparassitari ed i protocolli terapeutici utilizzati (numero di trattamenti per ciclo di produzione e modalità di somministrazione).

Analisi statistica

L'analisi bivariata dell'effetto di ogni singolo fattore di rischio è stata effettuata con "two-by-two table" per la valutazione del rischio relativo (FREQ procedure, SAS system) (SAS, 1999).

Per l'analisi statistica è stato assunto un livello di significatività (p) inferiore a 0,05 per rigettare l'ipotesi nulla.

RISULTATI

Nel 2011 le aziende con un numero di capi macellati superiore a 2000 sono risultate il 10,69%, per un totale di 668 lotti e 95796 suini (rispettivamente 46,04% e 44,50% dei lotti e dei capi macellati nell'anno). Il numero di capi macellati per ogni azienda varia da 2065 a 8789 (*m* 3684; *SD* 1779; mediana 3265; I° quartile 2550; III° quartile 3696). Tutte queste aziende sono risultate positive, per un totale di 22112 capi e 535 lotti (pari rispettivamente al 23,08% ed al 80,09% dei lotti e dei capi macellati nell'anno). A livello di singola azienda la percentuale di lotti positivi varia dal 5 al 100% (*m* 28; mediana 22,2; I° quartile 7,4; III° quartile 42,4).

Nel 2012 le aziende con un numero di capi superiore a 2000 sono risultate il 12,65%, per un totale di 748 lotti e 113621 suini (rispettivamente 49,57% e 48,73 % dei lotti e dei capi macellati nell'anno). Il numero di capi macellati per ogni azienda varia da 2112 a 10125 (*m* 3665; *SD* 2007; mediana 2596; I° quartile 2585; III° quartile 3826). Tutte le aziende sono risultate positive, per un totale di 22666 capi e 486 lotti (pari rispettivamente al 19,90% ed al 65% dei lotti e dei capi macellati nell'anno). A livello di singola azienda la percentuale di lotti positivi varia dal 5 all'80% (*m* 23,1; mediana 21,5; I° quartile 13,1; III° quartile 31,1).

Degli undici fattori di rischio analizzati nelle 24 aziende selezionate, 5 sono risultati significativamente associati alla prevalenza di "milk spots" alla macellazione.

I risultati dell'analisi dei fattori potenzialmente associati alla prevalenza di "milk spots" alla macellazione sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1: Analisi delle variabili considerate in relazione alla prevalenza di “milk spot lesions” alla macellazione associata alla presenza di *Ascaris suum* in azienda (* Significatività: $p < 0,05$).

Table 1: Analysis of the considered variable factors in relation to the prevalence of “milk spot lesions” at slaughter which is directly associated to the *Ascaris suum* presence in pigs Piedmont farms (*Significance: $p < 0,05$).

Variabile	Categoria	Aziende Positivi		χ^2	OR	95% CI	p*		
		(n=24)	(n=12)						
		N	%						
STRUTTURA	Struttura	> 10 anni	14	8	57,1	0,69	2	0,29-14,6	0,40
		< 10 anni	10	4	40	-	-	-	-
	Grigliata	14	4	6	6,17	0,10		0,01-0,91	0,01*
Pavimentazione	Piena / Mista		10	8	80	-	-	-	-
		Truogolo	20	8	40	4,8	0	0-1,39	0,03*
ALIMENTAZIONE	Distribuzione	A pavimento/ Mista	4	4	100	-	-	-	-
		Truogolo	10	8	80	6,12	10	1,10-117,99	0,01*
Alimentazione	Lungo		14	4	28,6	-	-	-	-
		Secca	10	8	80	6,17	10	1,10-117,99	0,012*
		Liquida/ Mista	14	4	28,6	-	-	-	-
IGIENE	Tutto vuoto	Si	6	4	66,7	0,89	2,50	0,27-27	0,34
		No/Parziale	18	8	44,4	-	-	-	-
	Lavaggio	Acqua calda	6	0	0	8	0	0-0,68	0,005*
		Acqua fredda	18	12	66,7	-	-	-	-
Disinfezione	Si	24	12	50	-	-	-	-	
	No	0	0	0	-	-	-	-	
Trattamenti di routine	Si	22	10	45,5	2,18	0	0-4,30	0,14	
	No	2	2	100	-	-	-	-	
ANTIPARASSITARI	Numero di trattamenti	>1 a ciclo	8	2	25	2,12	0,25	0,02-2,28	0,14
		<1 a ciclo	14	8	57,1	-	-	-	-
		In acqua	18	5	27,8	0,38	0,50	0,03-7,30	0,53
Somministrazione	Nel mangime	4	2	50,0					

DISCUSSIONE

L'obiettivo del lavoro era individuare i fattori di rischio, legati ad alcune caratteristiche strutturali e di *management*, maggiormente associati alla presenza di *Ascaris suum* nelle aziende presenti sul territorio.

Lo stabilimento oggetto di studio macella il 30% circa dei capi macellati in Piemonte e risulta quindi rappresentativo della realtà regionale; inoltre, essendo disponibili per lo stesso stabilimento i dati a partire dal 2005, è stato possibile un raffronto con le prevalenze registrate negli anni precedenti.

La positività di un'azienda è stata determinata utilizzando come riferimento i registri di macellazione relativi all'ispezione *post mortem* presenti nella Banca Dati Regionale (Infomacelli); in sede di macellazione, infatti, la presenza di “milk spots lesions” sul fegato comporta il sequestro dell'organo e la segnalazione da parte del Veterinario Ufficiale all'ASL di competenza.

Le “milk spot lesions” non sono correlate alla presenza di soggetti adulti nell'ospite, ma

indicano che l'animale ha ingerito delle uova di ascaride nelle 4 - 8 settimane precedenti la macellazione, e sono quindi un buon indicatore del livello di infestazione presente nell'allevamento.

La registrazione delle variabili identificate come fattori di rischio a livello aziendale è stata effettuata mediante la somministrazione di un questionario agli allevatori.

Una prima importante considerazione è sicuramente relativa alla prevalenza; dai dati ottenuti l'ascaridiosi risulta essere una parassitosi ancora estremamente diffusa (23,08% nel 2011, 19,9% nel 2012%), con prevalenze sostanzialmente sovrapponibili a quelle del 2005 (20,06%).

I valori riscontrati, peraltro, concordano con quanto riportato a livello regionale e anche in altri Paesi europei, dove si registrano prevalenze comprese tra il 15 ed il 50%.

Dall'analisi dei fattori di rischio, non risultano differenze di prevalenza in relazione alla pratica del sistema di tutto pieno/tutto vuoto e alla pratica di disinfezione a fine ciclo; è importante ricordare che *Ascaris suum* ha un'altissima resistenza ai comuni detergenti utilizzati in azienda ed ai fattori ambientali (anche in assenza di animali) e che la devitalizzazione delle uova avviene in condizioni quali essiccamento totale, luce solare diretta, assenza di ossigeno. Allo stesso modo, non risultano differenze di prevalenza in relazione all'anno di costruzione e/o ristrutturazione dell'azienda (costruzioni e/o interventi ristrutturativi fatti anteriormente ai 10 anni).

L'utilizzo di antiparassitari e di differenti protocolli terapeutici (per numero di trattamenti per ciclo e per modalità di somministrazione), non influisce sulla riduzione della prevalenza di *Ascaris suum* in azienda.

Un programma di controllo realmente efficace dovrebbe essere basato sulla diagnosi copromicroscopica e su un programma antiparassitario predeterminato e mirato alla reale situazione in allevamento.

Nell'ingrasso, nelle aziende considerate, è pratica comune fare un singolo trattamento antelmintico all'ingresso; come già riportato in letteratura, tali protocolli di routine “a tappeto” risultano inefficace a ridurre la prevalenza del parassita a livello aziendale e non riducono il numero di fegati sequestrati per “milk spot lesions” alla macellazione.

Il ricorso a trattamenti di tipo strategico “target” (in caso di animali in riproduzione, eventualmente anche individuali) in relazione alla categoria dei capi ed alla carica infestante, permetterebbe, oltre che una riduzione dei costi, una riduzione del rischio di fenomeni di farmaco-resistenza.

Dai dati ottenuti nel presente studio, emerge come esista una correlazione positiva statisticamente significativa tra la pavimentazione piena o mista e la positività per ascaridi; nelle aziende con pavimentazione grigliata, infatti, è minore la probabilità che l'azienda sia infestata e che i lotti alla macellazione siano positivi.

Il rischio d'infestazione tende ad aumentare se i suini sono allevati su pavimenti solo parzialmente grigliati o addirittura pieni perché l'accumulo di feci a terra può fornire rifugio ai parassiti, favorire il microambiente adatto all'embrionatura delle uova, ostacolare l'efficacia di pulizie e disinfezioni anche ripetute. Allo stesso modo risulta una correlazione positiva tra l'alimentazione con mangime e la positività per ascaridi; a differenza dell'alimentazione liquida, il mangime secco tende ad essere maggiormente disperso nell'ambiente e a mescolarsi con le feci, contribuendo al mantenimento dell'infestazione oro-fecale.

La distribuzione del cibo con il truogolo, rispetto che a pavimento, riduce significativamente il livello d'infestazione in azienda ed il conseguente rilievo di “milk spot lesions”; inoltre risulta statisticamente minore la prevalenza nel caso di utilizzo di truogolo lungo.

Particolarmente significativa nel ridurre la prevalenza di *Ascaris suum* risulta la pratica di lavaggio con acqua calda a fine ciclo produttivo; come riportato in letteratura (Nilsson,

1982), la pulizia, anche se accurata, con acqua ad alta pressione sembra essere inefficace per rimuovere completamente – o quanto meno ridurre significativamente – le uova di *Ascaris suum* dall'ambiente. Particolarmente problematiche, inoltre, risultano le superfici ruvide e irregolari perché forniscono un buon microambiente per lo sviluppo delle uova.

La pulizia del pavimento con acqua calda o vapore riduce significativamente il livello di infestazione in azienda; nelle aziende in cui viene effettuata, infatti, alla macellazione è minore sia la percentuale di lotti positivi, sia la percentuale di animali positivi per ogni lotto. L'utilizzo del vapore, inoltre, pur essendo il metodo più efficace per devitalizzare le uova di ascaridi, a livello aziendale è di difficile attuazione.

La lotta all'ascaridiosi a livello aziendale deve quindi prevedere, oltre ad un trattamento farmacologico mirato, degli adattamenti strutturali e gestionali bilanciando i costi derivanti da tali implementazioni e/o modifiche con le perdite economiche dovute ad una minore efficienza produttiva dell'allevamento (Pedersen et al., 2002). Focalizzandosi su quei fattori statisticamente significativi per la riduzione dell'ascaridiosi in allevamento, alcune pratiche come l'adozione di acqua calda per il lavaggio degli ambienti non comporterebbero un considerevole aumento dei costi per l'allevatore e uno sconvolgimento delle normali pratiche igienico-sanitarie. Al contrario, l'adattamento della pavimentazione, in conformità con la normativa sul benessere animale, richiederebbe un investimento considerevole che potrebbe non essere commisurato alle perdite economiche indotte da un'infestazione moderata da *Ascaris Suum*¹.

CONCLUSIONI

L'ascaridiosi risulta essere una parassitosi ancora estremamente diffusa; nonostante la disponibilità di molecole attive sia sugli stadi larvali che sugli adulti, i progressi zootecnici e l'utilizzo di diverse tecnologie, oggi si registrano prevalenze simili a quelle rilevate in studi fatti negli anni '60 e '70. Dal momento che il controllo dell'ascaridiosi è strettamente correlato ad un management aziendale finalizzato alla riduzione del numero di uova nell'ambiente, è ipotizzabile, se non un aumento, una rivalutazione del problema-ascaridi, attualmente sottostimato dagli allevatori. Oggi, infatti, di fronte all'aumento di richieste da parte dei consumatori e del legislatore di effettuare modifiche nelle tecniche di produzione zootecnica riguardanti l'impatto ambientale delle produzioni ed il benessere degli animali allevati (pavimentazione, lettiera, box multipli, etc.), potrebbero accrescere a livello aziendale le circostanze favorevoli allo sviluppo ed al mantenimento della parassitosi. Inoltre, alla luce dei risultati raggiunti in questo lavoro, considerando le perdite economiche dovute alla riduzione delle performance produttive dei suini (Pedersen et al., 2002), potrebbe risultare importante un approfondimento sui potenziali investimenti di adeguamento strutturale e sugli effetti dovuti a cambiamenti gestionali, quali sistema di alimentazione e lavaggio, in aziende studio rappresentative della realtà piemontese.

BIBLIOGRAFIA

Baldelli B. (1949). Sopra la frequenza degli elminti gastrointestinali nei suini dell'Umbria dedotta da esami coprologici. Atti SISVET 3, 603-608.

Baldelli B., Ambrosi M., Polidori G.A., Riili S. (1974). Le verminosi gastrointestinali del suino. Agenti eziologici e loro diffusione. Suinicoltura 10, 41-47.

Kipper, M., Andretta, I., Monteiro, S.G., Lovatto, P.A., Lehnen, C.R. (2011). Meta-analysis of the effects of endoparasites on pig performance. Veterinary Parasitology 181, 316-320.

Nilsson, O. (1982). Ascariasis in the pig. An epizootiological and clinical study. Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum 79, 1-108.

Pedersen, S., Saeed, I., Michaelsen, K. F., Friis, H., Murrell, K. D. (2002). Impact of protein energy malnutrition on *Trichuris suis* infection in pigs concomitantly infected with *Ascaris suum*. Parasitology 124, 561-568.

Poglayen, G., Martini, M. (1985). Osservazioni sulla diffusione di parassiti gastrointestinali del suino in rapporto a diverse caratteristiche di allevamento. Rivista di zootecnia e veterinaria 13(2), 102-106.

Prezzario Regionale Regione Piemonte, 2013.

Rambozzi, L., Burzio, G., Martano, G., Panero, F. (2006). A slaughter survey for *Ascaris suum* infection in North-Western Italy. Italian Society for Swine Pathology and Breeding (SIPAS). Annual meeting 32, Modena (Italy), 23-24 Mar 2006.

Restani R. (1969). Indagini orientative sulla distribuzione dei nematodi gastrointestinali dei suini in Italia. Veterinaria italiana 20, 278-303.

SAS/STAT®, 1999, User's Guide. Version 8. Cary, NC:SAS Institute Inc.

Tassi P., Widenhorn O. (1972). Indagine orientativa sulla distribuzione della strongilosi gastrointestinale in allevamenti di bovini, ovini, caprini, equini e suini in Italia. Parassitologia 14(2-3), 381-398.

Van Meensel, J., Kanora, A., Lauwers, L., Jourquin, J., Goossens, L., Van Huylenbroeck, G. (2010). From research to farm: ex ante evaluation of strategic deworming in pig finishing. Vet Med-Czech 55, 483-493. Vercruyse J., Geurden T., 2003. *Ascaris Suum* Diagnosis. Pig Progress Parasites, S. 18.

¹ Costo pavimentazione fessurata ≈ 20,00 Euro/m² (Fonte: Prezzario Regione Piemonte, 2013).

**EFFETTO LUTEOLITICO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI
UN AGONISTA DELLE PGF2ALFA IN SCROFETTE PUBERI
DURANTE DIVERSE FASI DEL CICLO ESTRALE**

***ESTRUS RESPONSES AFTER ADMINISTERING
CLOPROSTENOL DURING THE LUTEAL PHASE OF THE
ESTROUS CYCLE OF GILTS***

MAZZONI C.¹, KIRKWOOD R.N.², MACCHI E., SALERI R.⁴, MONGKOL T.⁵,
DE RENSIS F.¹

University of Parma, Italy

¹ *Department of Food Science, University of Parma, Italy*

² *School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Australia*

³ *Department of Veterinary Morphophysiology, University of Turin, Italy.*

⁴ *Department of Veterinary Medicine, University of Parma, Italy.*

⁵ *Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand*

Parole chiave: scrofette, prostaglandine, luteolisi ciclo estrale

Key words: gilts, prostaglandin, synchronization, oestrus cycle

Riassunto

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se nella scrofetta la doppia somministrazione a livello perivulvare di una dose elevata di cloprostenolo (analogo di sintesi delle PGF2alfa) sia in grado di indurre una luteolisi al 7°, 9° o 10° gg del ciclo estrale. Per questo scopo 87 scrofette puberi sono state trattate con una doppia (ore 08:00 e 14:00) somministrazione di 75 µg D-cloprostenol al 7° (gruppo D7, n°=30), 9° (gruppo D9; n°=29) e 10° (gruppo D10; n°=28) giorno del ciclo estrale. La durata del ciclo estrale durante il quale è stato effettuato il trattamento è stata confrontata con la durata del ciclo estrale precedente al trattamento. Il profilo ematico del progesterone è stato determinato in dieci scrofette del gruppo D9.

In tutti e tre i gruppi la durata del ciclo estrale con il trattamento non è stata diversa dal ciclo estrale precedente al trattamento (tra i 18 ed i 19 gg). I livelli plasmatici di progesterone dopo il trattamento si sono ridotti in 7/10 scrofette ma solo in 3 scrofette si sono mantenuti bassi 72 ore dopo il trattamento (intorno ai 1.3±0.9 ng/ml).

I risultati di questo studio indicano che la doppia somministrazione di D-Cloprostenolo a livello perivulvare al 7°, 9° o 10° gg del ciclo estrale non induce una luteolisi completa ma solo parziale e la durata del ciclo estrale non viene modificata.

Abstract

The aim of this study has been to evaluate if a double, perivulval large dose of PGF2alfa can induce luteolysis before day 12 of estrus cycle in gilts. Following a pre-treatment estrous cycle, 87 gilts were assigned to receive vulva injections of 75 µg D-cloprostenol at 08:00 and 14:00 h on day 7 (group D7; n=30), day 9 (group D9; n=29) or day 10 (group D10; n=28) of their second observed estrous cycle. Comparisons were made between the previous control and the following treatment estrous cycles. Ten D9 gilts were blood sampled 6 h prior to first injection and at 24 and 72 h after the second injection and samples assayed for progesterone content.

Compared to pre-treatment levels (15.8±0.7 ng/ml), plasma progesterone concentrations were reduced ($p<0.05$) at 24 h (6.4±0.4 ng/ml) in 7 of 10 gilts. However, at 72 h serum progesterone had returned to pre-treatment levels in 4 of the 7 gilts while in the remaining 3 gilts serum progesterone concentrations continued to fall to 1.3±0.9 ng/ml. Across all treatments, the duration of the treatment estrous cycle was not affected by D-cloprostenol administration. These data indicate that swine corpora lutea are sensitive to prostaglandins from day 9 of the estrous cycle but that a terminal luteolysis usually does not ensue.

INTRODUZIONE

Nella moderna azienda suinicola l'ottimizzazione dei flussi in gestazione, passa attraverso un attento rispetto dei teorici di copertura. Tutto ciò si rende possibile solo grazie alla disponibilità di un adeguato numero di scrofette da inseminare per banda. Tuttavia, per evitare di doverne mantenere un elevato numero in attesa di copertura, risulta particolarmente efficiente sincronizzarne gli estri. Per fare questo sono spesso utilizzati degli analoghi del progesterone o le gonadotropine ipofisarie. Questi sistemi richiedono comunque del tempo, hanno dei costi e non sempre danno i risultati attesi. In altri animali domestici per sincronizzare gli estri sono molto utilizzate le prostaglandine (De Rensis et al., 1999). Purtroppo, nella specie suina, non è al momento possibile indurre la luteolisi con una singola somministrazione di prostaglandine prima del 12° giorno del ciclo estrale (Diehl et al., 1974; Guthrie et al., 1976) e quindi le prostaglandine non sono utilizzate per tali fini. I motivi legati alla loro mancata efficacia come agenti luteolitici nella scrofa ciclica, non sono stati ancora chiariti (vedi De Rensis et al., 2012). Studi effettuati *in vitro* riportano che l'assenza di un effetto luteolitico delle PGF2alfa nella specie suina non sia però dovuto alla mancanza di recettori per le PGF2alfa stesse (Gadsby et al., 1990, 1993). Questa osservazione è confermata da studi in vivo nei quali è stato osservato che in scrofette puberi la multipla somministrazione di prostaglandine dal gg 5° al gg 10° del ciclo estrale induce luteolisi e riduce la durata del ciclo estrale (Estill et al., 1993, 1995). Inoltre, Kuge et al., (2006) nei minipig, riportano che la doppia somministrazione di D-Cloprostenolo a livello perivulvare è in grado di ridurre la durata del ciclo estrale e sincronizzare gli estri.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare l'effetto luteolitico di un protocollo di somministrazione di che preveda un doppio intervento di PGF2alfa a livello perivulvare. È stata utilizzata la doppia somministrazione di prostaglandine in quanto, nel suino, le prostaglandine endogene al momento della luteolisi, sono rilasciate con pulsè ad intervalli di circa 6-8 ore (Gleeson et al., 1974). Come sito d'inoculazione è stata scelta la zona perivulvare poiché permette di ridurre del 25% la quantità di PGF2alfa da somministrare rispetto alla tradizionale somministrazione i.m. a livello del collo, a conseguenza del mancato catabolismo polmonare (Kirkwood et al 1996).

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono state utilizzate un totale di 87 scrofette suddivise in 3 gruppi:

Gruppo D7 (n°= 30): a questi animali sono stati somministrati 75mg di D-Cloprostenolo a livello perivulvare al 7° giorno del ciclo estrale;

Gruppo D9 (n°=29): gli animali di questo gruppo sono stati trattati come al gruppo D7 ma al 9° gg del ciclo estrale;

Gruppo D10 (n°=28) gli animali di questo gruppo sono stati trattati come i precedenti ma al 10° gg del ciclo estrale.

Le prostaglandine sono state somministrate in una doppia somministrazione alle ore 08.00 e 14.00 (75mg di D-Cloprostenolo per ciascuna somministrazione).

Per la determinazione dei livelli ematici di progesterone, a 10 scrofette del gruppo D9 sono stati effettuati dei prelievi ematici dalla vena auricolare 6 ore prima e 24 e 72 ore dopo il trattamento con D-Cloprostenolo.

Analisi statistica.

I dati sono stati analizzati utilizzando il sistema analitico SPSS. Le differenze nei cicli estrali (quello precedente al trattamento e quello del trattamento) sono state analizzate mediante il test Wilcoxon test. I livelli ematici di progesterone sono stati analizzati mediante il test di varianza repeat measures.

RISULTATI

Non sono state osservate differenze tra la durata del ciclo estrale precedente al trattamento e quella del ciclo estrale del trattamento (Tabella 1). Si è osservata una tendenza ($P=0.07$) per il gruppo D10 a presentare una riduzione del ciclo estrale di circa 1.1 giorni (Tab.1).

I livelli ematici di progesterone si sono ridotti in 7/10 scrofette 24 ore dopo la somministrazione di cloprostenolo. Si sono poi mantenuti a livelli di 1.3±0.89 ng/mL 72 ore dopo il trattamento in 3/10 mentre nelle restanti scrofette sono tornati a livelli pre-trattamento.

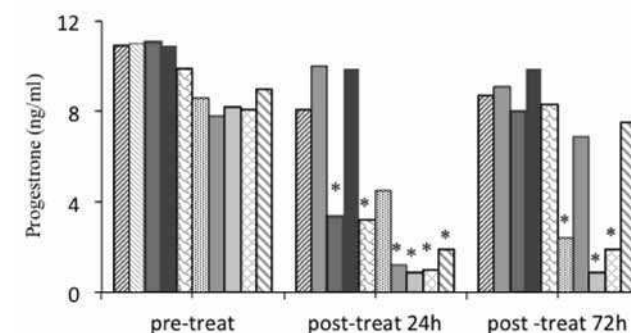
Tab. 1. Effetti della somministrazione di D-coprostenolo al giorno 7, 9 o 10 del ciclo estrale sulla durata del ciclo estrale (mean±SD).

Table 1. The effects of D-cloprostenol injection on days 7, 9 or 10 of the estrous cycle on inter-estrus interval length in gilts (mean±SD).

Giorno del trattamento	No. di scrofette	Durata del ciclo estrale del trattamento (g)	Durata del ciclo estrale precedente al trattamento (g)	Probabilità P
7	30	20.6±0,7	20.1±0,2	P=0.45
9	29	19.2±0.4	20.2±0.4	P=0.35
10	28	18.9±0.5	20.0±0.5	P=0.07

Figura 1. Livelli plasmatici di progesterone prima (-6 ore) e dopo (+24 e +72 ore) la somministrazione di una doppia (6 ore di intervallo) somministrazione D-Cloprostenol al giorno 9 del ciclo estrale.

Figure 1. Gilt plasma progesterone levels 0, 24 and 72 h after two vulva injections of D-cloprostenol 6 h apart on day 9 of their estrous cycle.



DISCUSSIONE

In letteratura è riportato che la multipla somministrazione di PGF2alfa (Estill et al., 1993, 1995) o la doppia somministrazione di PGF2alfa a livello perivulvare (Kuge et al.2006) è in grado di indurre la luteolisi già al settimo giorno del ciclo estrale. In questo studio, utilizzando un protocollo simile a quelli sopra descritti, l'ipotesi che la doppia somministrazione di prostaglandine nelle scrofette al 7°, 9° o 10° gg del ciclo estrale per via perivulvare potesse causare una luteolisi e a modificare la lunghezza del ciclo estrale non è stata avvalorata.

Queste differenze tra gli studi potrebbero essere dovute al numero delle somministrazioni utilizzate (ridotto nel nostro studio rispetto a quello di Estill et al., 1993, 1995), oppure a differenze nel tipo di suino utilizzato (minipig nel lavoro di Kuge et al., 2006, scrofette commerciali nel nostro studio).

Il profilo del progesterone da noi valutato, indica che almeno in alcuni animali le prostaglandine possono indurre una riduzione dei livelli ematici di progesterone anche prima del 12°g del ciclo estrale. La variabilità nella risposta osservata potrebbe essere legata al numero di corpi lutei presenti. Infatti, le scrofette che hanno risposto al trattamento, erano quelle che avevano i livelli plasmatici di progesterone più bassi all'inizio dello studio. Purtroppo il numero di osservazioni e il protocollo sperimentale utilizzato non permettono di dare una risposta a questa ipotesi.

Il risultato di questo studio suggerisce che se in futuro saranno messe a punto delle prostaglandine con un effetto più potente e prolungato di quelle ora disponibili, sarà possibile avere un effetto luteolitico prima del 12° gg del ciclo estrale e, quindi, presumibilmente, sincronizzare gli estri nelle scrofette anche mediante la somministrazione di prostaglandine.

BIBLIOGRAFIA

De Rensis F., Saleri R., Tummaruk, P., Techakumphu M., Kirkwood R.N. (2012) "Prostaglandin F2 α and control of reproduction in female swine: a review". *Theriogenology* 77, 1-11.

De Rensis F., Peter A.R.. (1999) "The control of follicular dynamics by PGF2 α , GnRH, hCG and estrus synchronization in cattle". *Reprod. Dom. Anim.* 34, 49-59.

Diehl J.R., Day. B-N. (1974) "Effect of prostaglandin F α on luteal function in swine". *J. Anim. Sci.* 39, 392-396.

Estill C.T., Britt, J.H., Gadsby J.E. (1993) "Repeated administration of prostaglandin F2 α during the early luteal phase causes premature luteolysis in the pig". *Biol. Reprod.* 49, 181-185.

Estill C.T., Britt, J.H., Gadsby J.E. (1995) "Does increased PGF2 α induce luteolysis during early diestrus in the pig?" *Prostaglandins* 49, 255-267.

Gadsby J.E., Balapure A.K., Britt J.H., Fitz T.A. (1990) "Prostaglandin F2 alfa receptors on enzyme dissociated pig luteal cells throughout the estrous cycle". *Endocrinology* 126, 787-795.

Gadsby, J.E., Lovdal J.A., Britt J.H., Fitz T.A. (1993) "Prostaglandin F2 alpha receptor concentrations in corpora lutea of cycling, pregnant, and pseudopregnant pigs". *Biol. Reprod.* 49, 604-608.

Guthrie, H.D., Polge C. (1976) "Luteal function and oestrus in gilts treated with a synthetic analogue of prostaglandin F2 α (ICI79.939) at various times during the oestrus cycle". *J. Reprod. Fertil.* 48, 423-425.

Gleeson, A.R., Thorburn, G.D., Cox R.I. (1974) "Prostaglandin F concentration in the utero-ovarian venous plasma of the sow during the luteal phase of the estrous cycle". *Prostaglandin* 5, 521-529.

Kirkwood R.N., Thacker P.A., Aherne F.X., Goonewardene L.A. (1996) "The effect of dose and route of administration of prostaglandin F2 α on the parturient response of sows". *J Swine Health Prod.* 4, 123-126.

Kuge T., Iwata H., Kuwayama T., Domeki L., Shioya Y., Monji Y.I. (2006) "Induction of estrus by prostaglandin F2alfa administration in the vagina vestibules of miniature pig". *J. Reprod. Dev.* 52, 391-396.

L'ESAME ISPETTIVO ANTE-MORTEM PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE DELLE SCROFE IN ALLEVAMENTO

ANTE-MORTEM INSPECTION FOR THE EVALUATION OF THE FARM WELFARE IN SOWS

VEZZOLI F.*, BENEDETTI V*., SINELLI M.**., LUINI M.*

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Lodi*

*** Asl Della Provincia Di Lodi*

Parole Chiave: benessere, scrofa, macello

Key Words: welfare, sow, slaughterhouse

Riassunto: Il nostro studio nasce all'interno di un Progetto di Ricerca Ministeriale in corso che ha come obiettivo quello di verificare se sia possibile utilizzare al macello le stesse osservazioni animal based che possono essere rilevate in allevamento utilizzando la metodologia proposta dal Welfare Quality®. In questa fase preliminare è stata presa in considerazione la categoria scrofe. E' stata costruita una scheda per la registrazione dei rilievi riferibili al benessere animale, osservabili al macello durante la visita ispettiva ante-mortem. Tali rilievi sono elencati in 4 gruppi riferiti al comportamento (Good housing), all'alimentazione (Good feeding), alla appropriatezza dei ricoveri (Good Housing) e alla salute degli animali (Good health) per presenza di lesioni o di malattie. Sono state effettuate osservazioni su 758 scrofe pervenute al macello direttamente da 3 allevamenti (rispettivamente n. 263, 60 e 90) e da un centro di raccolta (n. 345). Su un totale di 404 osservazioni di "non conformità", oltre il 40% sono riferite a Good health (lesioni), il 36,3% a Good housing, per la presenza di bursiti e ulcere o di imbrattamento fecale soprattutto in un allevamento. Un BCS insufficiente (Good feeding) è stato rilevato in una piccola percentuale delle scrofe, soprattutto in un allevamento. Problemi di Good health (malattia) hanno interessato l'11,2% delle osservazioni. Il nostro studio evidenzia che le osservazioni al macello effettuate in fase ante mortem, soprattutto se completate da rilievi ispettivi post-mortem, possono rappresentare, con alcune limitazioni, un efficace sistema per il monitoraggio del benessere a livello di allevamento.

Abstract: Our study is part of a in progress Research Project that aims to verify whether it is possible to use at slaughter the same observations proposed by the Welfare Quality ®. In this preliminary phase was taken into account the category sows. A check list for recording the findings related to animal welfare, observed at the slaughterhouse during ante-mortem inspection has been prepared. These findings are listed in 4 principles regarding behavior (Appropriate behavior), feeding (Good feeding), housing (Good Housing) and animal health (Good health) for the presence of injury or diseases. Observations were made on 758 sows received directly to slaughter from 3 herds (respectively n. 263 , 60 and 90) and from a holding pens (n. 345) . Out of a total of 404 observations of " non-compliance" , more than 40% are related to Good health (lesions), 36.3% to Good housing, due to the presence of bursitis and ulcers or fecal soiling especially in one herd. An inadequate BCS (Good feeding) has been detected in a small percentage of sows, especially in one herd. Good health problems (diseases) are involved in the 11,2 % of the observations. Our study shows that the observations made during the ante mortem inspection, especially if supplemented by post-mortem inspection findings, with certain limitations, may be an effective system for monitoring the welfare at farm level.

INTRODUZIONE

Il benessere animale è sempre più considerato come una componente essenziale di un “sistema integrato di qualità della produzione di alimenti di origine animale” che garantisca ai consumatori prodotti provenienti da allevamenti che non inquinano l’ambiente e dove gli animali sono allevati secondo criteri che soddisfano le loro esigenze basilari. L’Unione europea riconosce gli animali come esseri senzienti e meritevoli di tutela. La normativa comunitaria stabilisce inoltre prescrizioni minime volte a proteggere gli animali da sofferenze inutili durante l’allevamento, il trasporto e la macellazione. Le norme attualmente in vigore relative alla protezione degli animali negli allevamenti, (decreto legislativo n.146 del 26 marzo 2001, Decreto Legislativo n. 122 del 7 luglio 2011, attuazione della direttiva 2008/120/CE) s’incentrano sulla valutazione di diversi fattori esterni che possono influire sul benessere piuttosto che sulla risposta dell’animale a tali fattori. Questi indicatori portano ad una “valutazione del rischio” della condizione di benessere, ma non ad una valutazione del loro reale effetto o esito sugli animali, possono includere sia le risorse disponibili per l’animale nel suo ambiente, ad esempio lo spazio a disposizione e il tipo di pavimentazione, sia le pratiche di gestione dell’animale in azienda, ad esempio come e quando l’allevatore alimenta l’animale oppure le procedure di svezzamento utilizzate. L’impiego di misurazioni direttamente compiute sull’animale (animal based) per valutarne il benessere è relativamente nuovo. Un recente parere scientifico dell’European Food Safety Authority (2012a) prende in considerazione l’efficacia di valutare le risposte degli animali a fattori presenti nel loro ambiente come approccio alternativo o talvolta complementare alla valutazione dei fattori stessi. La logica di tale approccio è che le misurazioni effettuate direttamente sull’animale mirano a determinare lo stato effettivo del benessere dell’animale e comprendono pertanto sia gli effetti dell’ambiente che le modalità di gestione dell’animale. La stessa Comunità Europea da tempo punta all’introduzione d’indicatori diretti ottenuti registrando e misurando specificamente le reazioni comportamentali, fisiologiche, patologiche e di produttività degli animali all’ambiente in cui sono allevati. A tale scopo l’Unione Europea ha finanziato un progetto, denominato Welfare Quality® (WQ®), per lo sviluppo di un sistema standardizzato della valutazione del benessere degli animali negli allevamenti, al termine del quale, nell’ottobre 2009, è stato pubblicato il protocollo per la valutazione del benessere del suino in allevamento (Welfare Quality® Protocol, 2009). Il protocollo fa riferimento in diverse sessioni alle differenti categorie della specie animale - suinetto, scrofa, accrescimento e finissaggio - e ai differenti stadi della loro vita. Nel protocollo sono identificati quattro principi fondamentali che si dividono in dodici criteri indipendenti di benessere (Fig. 1). In ultimo sono stabiliti tra i 30 e i 50 parametri (per lo più animal-based) per valutare i dodici criteri di benessere giungendo così, attraverso l’elaborazione di punteggi sulla base dei dati raccolti, a una valutazione complessiva del welfare. EFSA (2012b) ha formulato un parere sull’uso di indicatori diretti nella specie suina (animal based) il parere conclude che i due approcci fin qui descritti sono complementari e che i parametri contenuti nel protocollo Welfare Quality® possono essere utilizzati efficacemente per valutare il benessere dei suini in allevamento poiché forniscono informazioni sui principali rischi individuati in precedenti pareri scientifici dell’EFSA (e.g. EFSA, 2004, 2005, 2006, 2007a, b, c). La ricerca scientifica ha messo in evidenza che nessun singolo indicatore è in grado di esprimere pienamente il benessere degli animali, mentre il loro utilizzo congiunto può consentire di ottenere una visione completa dello stato di adattamento e di benessere che poi si possono ripercuotere negativamente anche sulle performance produttive e riproduttive. Conseguentemente la valutazione del benessere deve essere un’analisi multifattoriale che include indicatori dello stato di salute, osservazioni sul comportamento degli animali, descrizione degli ambienti di

allevamento e informazioni sulle operazioni di routine e management che sono specifiche competenze della figura professionale del medico veterinario.

Questo lavoro preliminare nasce all’interno di un Progetto di Ricerca Ministeriale in corso che ha come obiettivo quello di verificare se sia possibile utilizzare al macello le stesse osservazioni animal based che possono essere rilevate in allevamento utilizzando la metodologia proposta dal WQ®, mettendo a punto un appropriato protocollo opportunamente validato in campo. In questo lavoro preliminare è stata presa in considerazione la categoria scrofe.

MATERIALI E METODI

Scheda di registrazione

E’ stata predisposta una scheda di registrazione delle osservazioni al macello eseguibili nella fase ante mortem al momento dello scarico, durante la sosta in stalla e durante la movimentazione dalla sosta allo stordimento (Tab. 1). Le valutazioni considerate sono tutte di tipo “animal based” e sono state suddivise in 5 punti e 16 valutazioni che riprendono i principi fondamentali del sistema WQ® (Appropriate Behaviour, Good feeding, Good housing, Good health) (Fig. 1). Il metodo utilizzato per la classificazione delle lesioni è quello previsto dal protocollo WQ®. La valutazione del BCS era eseguita secondo (Coffey, R. D. et al. 1999). Il comportamento degli animali che al momento dello scarico restavano fermi senza muovere testa e corpo (animali riluttanti a muoversi) o che arrivati alla rampa di scarico tornavano sul camion, veniva considerato come stato emozionale negativo da paura e registrato.

Scelta degli animali

In totale sono state sottoposte ad visita ante mortem 758 scrofe a fine carriera regolarmente macellate in un stabilimento situato nella provincia di Lodi e provenienti da 24 allevamenti situati in Lombardia e Piemonte. Delle 758 scrofe analizzate 413 erano giunte al macello direttamente da 3 allevamenti (All. A, B e C), rispettivamente 263, 60 e 90. Le rimanenti 345 dei rimanenti 21 allevamenti arrivavano al macello passando da un centro di raccolta (All.D) e le osservazioni non sono state attribuite a singoli allevamenti.

Le osservazioni sono state effettuate nel periodo Ottobre – Dicembre 2013

RISULTATI

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1, raggruppati per i diversi elementi di valutazione previsti dal sistema WQ.

Appropriate behaviour: il 6.34 % delle osservazioni riguardano questo punto e sono state registrate su 25 animali. 17 erano gli animali che restavano fermi (animali riluttanti a muoversi), 8 gli animali che arrivati alla rampa di scarico tornavano sul camion

Good feeding: 23 animali il 5.8 % delle osservazioni riguardavano scrofe con BCS inferiore a 2 (animali molto magri), mentre non sono state osservate scrofe grasse.

Good housing: relativamente a questo punto sono stati registrati 143 rilievi (36.3 % sul totale dei rilievi) di cui 24 bursiti, 46 ulcere della spalla e 73 riferiti ad imbrattamento fecale.

Good health (lesioni): nella valutazione delle lesioni il corpo della scrofa veniva suddiviso in 5 aree : spalla collo e testa, quarto posteriore, orecchie e arti, torace addome sono state registrate 169 lesioni pari al 40.4% di cui 43 zoppie, 8 ferite alle orecchie, 48 ferite agli arti, 13 ferite alla regione testa collo, 40 al torace addome, 9 ai quarti posteriori e 8 lesioni alla vulva.

Good health (malattia): il 11.2% delle osservazioni riguardavano la presenza di malattie e per la quasi totalità erano riferibili ad infezioni localizzate quali gli ascessi.

DISCUSSIONE

Oltre il 70% delle lesioni sono distribuite in maniera pressochè uguale tra rilievi riferibili a strutture d'allevamento non idonee e la presenza di lesioni. Il 36.3% delle osservazioni sono riferibili a strutture d'allevamento non idonee (Good housing) ed un esempio concreto è l'ulcera della spalla la cui eziologia è dovuta a diversi fattori concomitanti ma principalmente al decubito prolungato su pavimenti duri durante la permanenza in gabbia, decubito che comprime i vasi sanguinei deputati alla vascolarizzazione della cute e dei tessuti della spalla, questa compressione interrompe il flusso sanguigno danneggiando i tessuti e portando alla formazione delle lesioni. Le bursiti sono anch'esse causate da decubito su pavimentazioni non idonee. Il numero elevato di animali sporchi è un altro indice di strutture d'allevamento non idonee, confermata dal fatto che tutti gli animali registrati come sporchi provenivano da 1 allevamento. Lo stato sanitario (Good health) include l'assenza di ferite, malattie e dolore. Le ferite possono causare dolore acuto o cronico considerato uno stato emozionale avverso e quindi considerato un problema di benessere (Velarde A., Dalmau A. 2012). Le ferite possono essere causate dal personale addetto agli animali, da strutture aziendali non idonee perché progettate in maniera errata, obsolete o per mancata manutenzione. Le ferite possono essere dovute anche a combattimenti tra animali che sono più comuni quando gli animali devono competere per l'accesso al cibo o all'acqua in ambienti con spazi ristretti. Il body conditions score (Good feeding) è stato trovato insufficiente (<2) solo in 23 animali investigati e non sembra quindi essere un grave problema negli allevamenti considerati. Il comportamento (Appropriate behaviour) degli animali allo scarico, in particolare la riluttanza a muoversi o i tentativi di ritornare indietro sul camion, è ritenuto indicatore di paura (Velarde A., Dalmau A. 2012) ed è stato riscontrato in 25 animali. Per quanto riguarda le lesioni riferibili a malattie sono state osservate esclusivamente in 44 animali. Questo dato può essere ritenuto parziale in quanto nella nostra indagine è stato eseguito solo l'esame ante mortem e molte delle lesioni riferibili a malattie sono evidenziabili solo all'esame post mortem. Se osserviamo la percentuale di rilievi nelle diverse aziende possiamo notare che negli allevamenti A e D (centro di raccolta) sono rilevanti ferite e zoppie; per quanto riguarda gli animali che transitavano dal centro di raccolta la causa potrebbe essere dovuta al fatto che gli animali venivano rimescolati sia sul camion che nella stalla di sosta cosa che poteva comportare scontri tra animali per stabilire la gerarchia. Questo problema non avveniva o avveniva solo in parte per gli animali dei restanti allevamenti. Nell'allevamento B la percentuale maggiore di osservazioni è riferibile a scrofe magre ma è riferita ad un numero insufficiente di osservazioni per poter essere ritenuta valida.

Originariamente l'obiettivo dell'esame ispettivo al macello era indirizzato alla ricerca delle malattie a carattere zoonosico; in seguito il suo utilizzo è stato esteso alla sorveglianza epidemiologica sia a livello nazionale/regionale che a livello aziendale con la valutazione dell'incidenza delle più comuni lesioni osservabili al macello; polmoniti, pleuriti ascessi, ascaridiosi etc.. In anni più recenti è stata presa in considerazione la possibilità di utilizzare l'ispezione al macello nella valutazione del benessere animale (EFSA 2011, Swaby H. e Gregory N.G. 2012, Sanchez-Vasquez et al 2011,) definendolo un "economico strumento diagnostico" (Cleveland-Nielsen A. et al. 2004) nella classificazione del benessere animale ed in modo particolare le "animal based measures" sembra siano lo strumento migliore da questo punto di vista. Un buono stato sanitario degli animali è un prerequisito fondamentale del benessere animale (good health) molte delle malattie e/o lesioni riscontrate al macello (ferite, ascessi, zoppie) possono essere correlate direttamente ad errati sistemi di produzione. Tuttavia esistono alcuni limiti nell'utilizzo di questo strumento di valutazione evidenziati anche dal nostro lavoro. Per prima cosa è necessario distinguere tra lesioni occorse in allevamento,

durante il trasporto, nelle stalle dei centri di raccolta, queste ultime particolarmente importanti nel caso delle scrofe a fine carriera, e nelle stalle di sosta dei macelli. Un altro limite è dato dal fatto che questo sistema non tiene in considerazione la mortalità in allevamento da cause naturali o eutanasia così come al macello non possono essere osservate problematiche insorte precocemente in allevamento. Infine un altro limite messo in evidenza sia da EFSA (2011) che da diversi autori (Sanchez-Vasquez et al 2011, Dalmau A. et al 2009, Bonde M. et al 2010) è l'elevata variabilità in termini di sensibilità e specificità nella valutazione delle lesioni osservata tra diversi operatori.

CONCLUSIONI

Sulla base dei dati preliminari da noi raccolti possiamo confermare che l'esame ispettivo ante mortem al macello può essere considerato come un utile ed economico sistema da utilizzare nella valutazione del benessere animale in allevamento. I risultati da noi ottenuti hanno tuttavia bisogno di una validazione attraverso osservazioni parallele negli allevamenti di provenienza degli animali macellati. Resta inteso che si rende necessaria una adeguata formazione dei veterinari ispettori nell'ambito del benessere animale, per altro già prevista anche dal Regolamento (CE) 1099/2009 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento. La valutazione del benessere animale al macello utilizzando le "animal based measures" è sicuramente un momento di valorizzazione delle competenze veterinarie.

BIBLIOGRAFIA

Bonde M., Toft N., Thomsen P.T., Sorensen J.T.. 2010 Evaluation of sensitivity and specificity of routine meat inspection of Danish slaughter pigs using Latent class Analysis. Preventive Veterinary Medicine , 94(3-4): 165-169.

Cleveland-Nielsen A., Christensen G., Ersbøll A.K. 2004. Prevalences of welfare-related lesions at post-mortem meat-inspection in Danish sows. Preventive Veterinary Medicine, 64(2-4):123-131.

Coffey, R. D., Parker G. R. and Laurent K. M.. 1999. Assessing sow body condition. In Publ. ASC 158, University of Kentucky Cooperative Extension Service, Lexington, KY.
COMISURV 2011 Contribution of meat inspection to animal health surveillance in swine. EFSA Journal 9(10):7-13. 2531

Dalmau A., Temple D., Rodriguez P., Llonch P., Velarde A. 2009. Application of the Welfare Quality® protocol at pig slaughterhouses. Animal Welfare, 18: 497-498

EFSA (European Food Safety Authority), 2012 a. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. Statement on the use of animal-based measures to assess the welfare of animals. Parma, Italy EFSA Journal 2012;10(6):2767

EFSA (European Food Safety Authority), 2012 b. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on the use of animal-based measures to assess welfare in Pigs. EFSA Journal 2012;10(1):2512

Welfare Quality® Protocol, 2009. Welfare Quality® Assessment Protocol for pig (sows and piglets, growing and finishing pigs). Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands, 122 pp.

EFSA (European Food Safety Authority), 2004. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of castration of piglets. The EFSA Journal, 91, 1-18.

EFSA (European Food Safety Authority), 2005. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare of weaners and rearing pigs: effects of different space allowances and floor types. The EFSA Journal, 268, 1-19.

EFSA (European Food Safety Authority), 2007a. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission on Animal health and welfare aspects of different housing and husbandry systems for adult breeding boars, pregnant, farrowing sows and unweaned piglets. The EFSA Journal, 572, 1-13.

EFSA (European Food Safety Authority), 2007b. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission on Animal health and welfare in fattening pigs in relation to housing and husbandry. The EFSA Journal, 564, 1-14.

EFSA (European Food Safety Authority), 2007c. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission on the risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems. The EFSA Journal, 611, 1-13.

EFSA (European Food Safety Authority), 2011 Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). EFSA Journal, 9(10):2351, 198 pp.

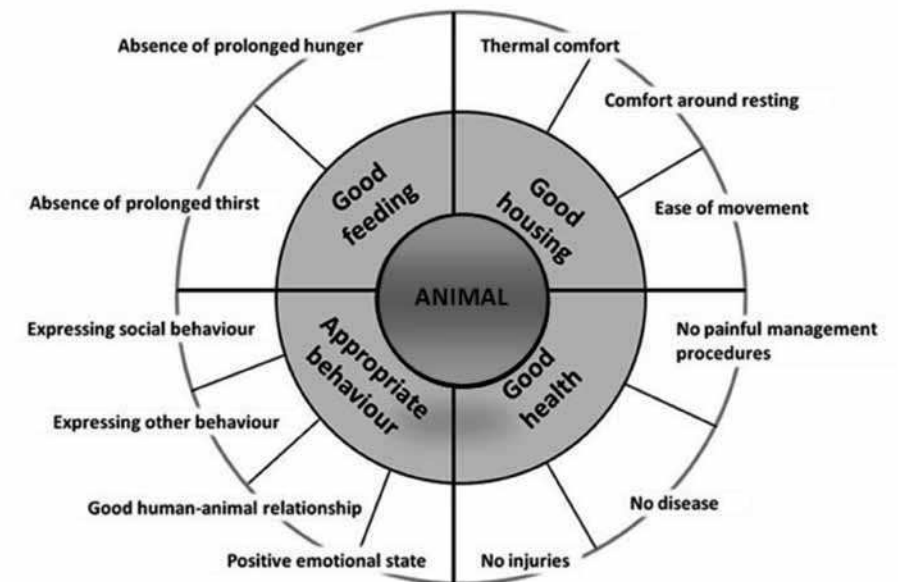
Sanchez-Vazquez MJ, Strachan WD, Armstrong D, Nielen M, Gunn GJ. 2011 The British pig health schemes: Integrated systems for large-scale pig abattoir lesion monitoring. Veterinary Record, 169(16):413

Swaby H., Gregory N.G. 2012: A note on the frequency of gastric ulcers detected during post-mortem examination at a pig abattoir. Meat Science, 90(1):269–271.

Velarde A., Dalmau A. 2012. Animal Welfare assessment at slaughter in Europe: Moving from input to outputs. Meat Science 92, 244-251.

Fig. 1 I quattro principi e 12 criteri animal based utilizzati come linee guida per un buon benessere secondo il progetto Welfare Quality® (Dalmau A. et al 2009)

Fig. 1 The four principles and 12 animal-based criteria used as guidelines for good welfare according to the Welfare Quality® project (Dalmau A. et al 2009)



Tab. 1 - Osservazioni eseguite al macello nella fase ante-mortem.

Tab. 1 - Findings at ante-mortem inspection in sows at slaughter.

TIPO DI RILIEVO	OSSERVAZIONI (GRADO)
Appropriate Behaviour	Riluttanza a muoversi / Torna indietro
Good feeding	BCS 1: Emaciata / BCS 5: Grassa
Good housing	Bursite (I, II) / Ulcera della spalla (grado 1, 2) / Imbrattamento fecale (grado 1, 2)
Good health – lesioni	Zoppia (grado 1, 2) / Infezioni localizzate (grado 1, 2) / Lesioni alla coda / Lesioni agli arti / Ferite sulle orecchie / Ferite Corpo / Lesioni alla vulva (grado 1, 2)
Good health – malattia	Sintomi respiratori / Dermatite / Prolasso uterino / Prolasso rettale / Ernie ombelicali o inguinali/ Diarrea

Tab 2 - Rilievi eseguiti sulle scrofe macellate provenienti da 3 allevamenti: A (263 scrofe) B(60 scrofe) C (90 Scrofe) ed una stalla di sosta D (345 scrofe). Le % sono espresse per ogni gruppo di rilievi sul totale dei rilievi eseguiti nello stesso allevamento o stalla

Tab 2 - Findings at slaughter in sows from 3 farms: A (263 sows) B (60 sows) C (90 sows) and a stable resting D (345 sows). % are expressed on the surveys carried out for each farm or stable resting on the total of the observations

RILIEVI ESEGUITI		ALL. A		ALL. B		ALL. C		ALL. D		TOT	
		N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
Appropriate behaviour	Riluttanza a muoversi	8		0		0		9		17	
	Torna indietro	3		0		0		5		8	
	Totale	11	11,1	0	0,0	0	0,0	14	7,1	25	6,34
Good feeding	BCS	3	3,0	3	37,5	2	2,2	15	7,6	23	5,8
Good housing	Bursite	10		0		2		12		24	
	Ulcera spalla	16		3		2		25		46	
	Imbrattamento fecale	0		0		73		0		73	
	Totale	26	26,3	3	37,5	77	85,6	37	18,8	143	36,3
Good health (lesioni)	Zoppia	13		0		3		27		43	
	Ferite orecchie	1		0		0		7		8	
	Ferite arti	21		1		2		24		48	
	Ferite anteriore	3		0		0		10		13	
	Ferite parte media	5		0		3		22		40	
	Ferite posteriore	1		0		0		8		9	
	Lesioni alla vulva	0		0		0		8		8	
	Totale	44	44,4	1	12,5	8	8,9	106	53,8	169	40,4
Good health (malattia)	Dermatite	6		0		0		3		9	
	Ernie	0		0		0		6		6	
	Infezioni localizzate	9		1		3		13		26	
	Prolasso uterino	0		0		0		9		3	
	Totale	15	15,2	1	12,5	3	3,3	25	12,7	44	10,9
Totale rilievi		99	100,0	8	100,0	90	100,0	197	100,0	404	100,0

STUDIO DI ARRICCHIMENTI AMBIENTALI PER IL MIGLIORAMENTO DEL BENESSERE IN SUINI IN SVEZZAMENTO

STUDY OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENTS FOR THE IMPROVEMENT OF WEANING PIGS WELFARE

SCALZOLARO E., SCOLLO A., GOTTARDO F.

Università degli Studi di Padova

Parole chiave: benessere animale, arricchimento ambientale, suinetti, svezzamento
Key words: animal welfare, environmental enrichment, piglets, weaning

Riassunto

Si esaminano gli effetti di diversi arricchimenti ambientali inseriti singolarmente nei box di suini in età da svezzamento. L'obiettivo è capire se tali arricchimenti costituiscono una fonte di interesse per l'animale, quanto è duraturo tale interesse e osservare se la presenza di questi oggetti si associa ad una maggior tranquillità ad una riduzione delle interazioni aggressive. Emerge una predilezione per le corde fino al 42° giorno di vita. Mentre l'interesse per le corde tende a scemare, a partire dallo stesso giorno diventa forte il desiderio di manipolare la paglia, oggetto che mostra un trend crescente di utilizzo nell'arco dello studio. Le catene sono sfruttate ma in minor misura rispetto alla corda e alla paglia mentre il tronchetto è l'oggetto meno gradito. Le lesioni sono maggiori nei box con le corde e con la paglia con differenze significative nelle settimane uno, quattro e cinque: le differenze sono associate al tipo di arricchimento usato, alla competizione tra animali per stabilire una gerarchia sociale e alla mole degli stessi (i più grossi sono quelli nei box con le corde e la paglia). Per quanto riguarda le lesioni alle orecchie e al collo, ossia le parti maggiormente interessate dalle graffiature, le ferite più gravi sono presenti nei box contenenti paglia e corde: è la maggior mole degli animali nei box contenenti corde e paglia il fattore determinante che porta ad una riduzione dello spazio per capo nei box e ad una maggiore aggressività tra soggetti.

Abstract

The effects of different environmental enrichments that are singularly situated inside weaning piglets' fences are the subject of this article. The purpose is understanding if such objects are interesting for the animals, how long this interest lasts and looking if their presence links directly to calmer and less aggressive piglets. The animals seem to prefer the ropes until the 42nd day of life. Starting from the same day, while the interest for the ropes decreases, the need to manipulate the straw grows. The straw has a growing trend of use during the research. The chains are used but less than the ropes and the straw, while the trunk is the least appreciated enrichment. Lesions are more common in the fences which contain ropes and straw, with differences that are statistically relevant in week one, four and five: these variations are linked to the type of enrichment, to the competition among animals for the establishment of a social hierarchy and to the weight of the pigs (the heaviest are those in the fences with ropes and straw). The severest ear and neck wounds (that are the body parts where more scratches can be noticed) can be found in the fences with ropes and straw: the pigs there are heavier and for this reason the space is limited leading to more aggressive piglets.

INTRODUZIONE

Il benessere è una condizione intrinseca dell'animale: il soggetto che riesce ad adattarsi all'ambiente si trova in uno stato di benessere, viceversa il soggetto che non ci riesce si trova in una condizione di stress. Molteplici definizioni di benessere animale sono state formulate, tra le tante: "Il benessere è uno stato di salute completo, sia fisico che mentale, in cui l'animale è in armonia con il suo ambiente" (Hughes, 1976).

Uno dei fattori che si associa ad una mancanza di benessere sono le stereotipie, considerate dei comportamenti relativamente invariati e ripetitivi, apparentemente privi di funzione nel contesto in cui vengono espressi (Mason, 1991). Nei suini si riscontrano prevalentemente stereotipie orali, quali mordere le sbarre, masticare a vuoto, manipolare la catena di contenimento, polidipsia od altre attività ripetitive. I fattori scatenanti, quali la stabulazione con ipo-stimolazione e limitazione di movimenti, stress sociale o carenza di materiale da manipolare (Fraser, 1975), determinano anche la frequenza di comparsa delle stereotipie. Numerose sono le attività auto- ed etero-dirette: in questa categoria rientrano le forme di tolettatura eccessiva fino all'auto-mutilazione, o lo sfregarsi contro strutture fino a prodursi lesioni. Suzione e leccamento di strutture intensificati si manifestano talvolta nei suinetti svezzati molto precocemente, mentre nelle scrofe si può notare polidipsia o pressione continua dell'abbeveratoio senza necessariamente ingerire grandi quantità di acqua. Suinetti svezzati precocemente manifestano maggiormente un'attività simile alla ricerca dei capezzoli materni, cioè il massaggio della zona perianale, dell'ombelico o dello scroto dei conspecifici; l'animale attaccato talvolta emette urina che viene ingerita dall'aggressore.

Altro fattore che limita il benessere dell'animale riguarda gli atteggiamenti aggressivi: tra i più frequenti ricordiamo le morsicature alle orecchie e alla coda così come le lesioni al resto del corpo. La scrofa invece incorre occasionalmente in atti di cannibalismo nei confronti della prole e ciò riguarda soprattutto le scrofette primipare più nervose.

Per tutti questi motivi risulta quindi fondamentale mettere in atto strategie che possano eliminare o quantomeno limitare i problemi legati alle stereotipie e all'eccessiva aggressività dei soggetti tramite l'uso di arricchimenti ambientali. Il concetto di arricchimento ambientale include un insieme di modalità di mantenimento e allevamento degli animali, il cui obiettivo è migliorare la qualità della loro vita attraverso l'identificazione e l'attuazione di stimoli ambientali necessari per il benessere fisiologico e psicologico degli stessi. L'arricchimento ambientale ha una vasta gamma di effetti fisiologici e comportamentali in varie specie animali e può essere particolarmente utile nel ridurre la frequenza o la gravità di comportamenti anormali/indesiderati o addirittura prevenire lo sviluppo degli stessi in prima battuta.

Newberry (1995) ha affermato che lo scopo di un arricchimento è quello di migliorare le funzioni biologiche di un animale e che gli obiettivi di un programma di arricchimento comprendono:

- l'aumento del numero e della varietà di comportamenti normali
- il prevenire lo sviluppo di comportamenti anormali o comunque la riduzione della frequenza o della gravità degli stessi
- l'aumento dell'utilizzo fruttuoso dell'ambiente (ad es. l'utilizzo dello spazio)
- l'aumento della capacità dell'animale di reagire alle sfide comportamentali e fisiologiche quali il contatto con gli umani, la manipolazione per esperimenti o le variazioni ambientali.

Bloomsmith et al (1991) categorizza i tipi di arricchimento ambientale in:

1. Arricchimento sociale, che comprende sia il contatto diretto che quello indiretto (visivo, olfattivo, uditivo) con i conspecifici o con gli umani.

2. Arricchimento occupazionale, che include sia l'arricchimento psicologico (ad es. dispositivi che permettano all'animale di prendere il controllo sull'ambiente) sia l'arricchimento che incoraggia il moto.
3. Arricchimento fisico, che comporta la modifica della grandezza o della complessità del recinto animale o l'aggiunta di accessori nel recinto quali oggetti, substrati o strutture permanenti.
4. Arricchimento sensoriale o stimoli visivi, uditivi o altre modalità (es. olfatto, tatto e gusto).
5. Arricchimento nutrizionale, che comprende sia il presentare all'animale cibi nuovi sia cambiare il sistema di distribuzione dell'alimento.

Quando si fornisce all'animale qualsiasi tipo di arricchimento ambientale, è fondamentale verificare i risultati per assicurarsi che il programma di arricchimento stia effettivamente centrando gli obiettivi prefissi.

MATERIALI E METODI

Tesi sperimentali

Lo studio ha valutato la risposta comportamentale di suinetti in svezzamento in presenza di diversi tipi di arricchimenti ambientali: catene metalliche, tronchetti di legno, paglia e corde. Ogni tipo di arricchimento è stato collocato in tre box in ciascuno dei quali erano presenti 25 suinetti. La paglia era messa a disposizione utilizzando una rastrelliera metallica di dimensioni pari a 55 x 23 x 50 cm appesa ad un lato del box. Dai fori di 5 cm della maglia del cesto i suinetti potevano accedere alla paglia. La corda invece erano appese ad un lato del recinto e restavano sospese da terra ad un'altezza di 10 cm. Anche la catena era posizionata su un lato del recinto e sospesa da terra ad un'altezza di 10 cm. Il tronchetto di una lunghezza di 30 cm era appeso tramite due catenelle metalliche e sospeso ad un'altezza di 15 cm da terra.

Animali, strutture di allevamento, modalità di gestione

Lo studio si è svolto in un allevamento commerciale costituito di scrofaia e svezzamento collocato nel comune di San Biagio di Callalta (TV).

Sono stati utilizzati complessivamente 300 suinetti di tipo genetico Goland sottoposti a vaccinazione, taglio della coda e castrazione in sala parto 7 giorni dopo la nascita. I suinetti erano separati dalla madre e collocati nei box di svezzamento 28 giorni dopo la nascita. Nelle strutture di svezzamento i suinetti sono stati ripartiti sulla base del peso in 12 box contenenti ciascuno 25 suinetti. I box dotati di pavimento grigliato ricoperto con gomma misurano 3.60 x 2.60 m.

I 12 box erano ripartiti in 2 stanze attigue e uguali per quanto riguarda le caratteristiche delle strutture e del microclima. I suinetti di ciascun box avevano libero accesso all'acqua e al mangime che veniva fornito nei primi giorni di svezzamento in mangiatoie circolari. Successivamente le mangiatoie circolari venivano rimosse e sostituite con quelle lineari.

Rilevi sperimentali

Le rilevazioni comportamentali sono state effettuate il primo giorno di svezzamento e successivamente a 3, 5, 7, 14, 21 e 28 giorni di svezzamento sempre due volte al giorno e all'incirca negli stessi orari.

Per ogni giornata di rilevazione sono state effettuate due sessioni di osservazione di un'ora ciascuna, una al mattino e una al pomeriggio. Utilizzando il metodo a Scan sampling con intervalli di campionamento di 5 minuti.

I comportamenti rilevati durante le singole sessioni di osservazione sono stati i seguenti:

- numero di animali che annusano/leccano l'arricchimento
- numero di animali che lo mordono l'arricchimento
- numero di animali in decubito
- numero di animali alla mangiatoia.

Sempre negli stessi giorni e per due volte nel corso della giornata applicando il metodo *Behaviour sampling* è stato registrato il numero di interazioni aggressive tra suinetti. Per mezz'ora il rilevatore posizionato in posizione centrale nella stanza registrava tutti gli eventi riferibili alle interazioni aggressive.

Parallelamente alle osservazioni comportamentali sono state rilevate le lesioni riportate da ogni suinetto presente nel box indicando zona colpita e gravità della ferita (punteggio da zero a due dove zero equivale ad assenza di lesioni e due indica il grado di gravità massima).

Analisi statistica

Tutti i dati raccolti sono stati archiviati su un foglio elettronico e successivamente sottoposti ad analisi statistica.

I dati comportamentali sono stati elaborati utilizzando un test di confronto tra percentuali basato sulla statistica chi-quadro, per saggiare l'effetto del diverso arricchimento entro settimana di osservazione. La stessa procedura statistica è stata applicata alle frequenze degli score di lesioni cutanee rilevati in diverse zone tipiche (testa, orecchie, collo, spalle, tronco e coscia, coda).

I dati relativi alle lesioni (score totali calcolati come somma dei singoli punteggi rilevati sulle diverse zone: testa, orecchie, collo, spalle) sono stati elaborati utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis per testare l'effetto del diverso tipo di arricchimento ambientale entro diversa settimana di osservazione.

RISULTATI

Annusa/lecca e morde l'arricchimento

Nelle prime due settimane indipendentemente dall'arricchimento inserito nel box, vi è un'una percentuale maggiore di soggetti intenti ad annusare e leccare l'oggetto; col passare del tempo questo comportamento tende a diminuire e già a partire dalla seconda settimana di osservazione la percentuale si abbassa (Fig. 1).

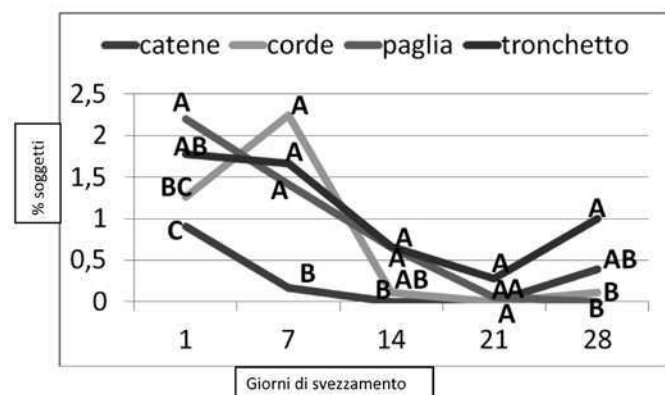


Figura 1 - Andamento nel corso dello svezzamento dei comportamenti di annusa/lecca
Figure 1 - Development throughout weaning phase of sniffing/licking

Per quanto riguarda l'atteggiamento "mordere" si nota invece come nelle prime due settimane sia chiara la preferenza dei suinetti per le corde: la percentuale di soggetti intenti a mordere infatti aumenta dal 5% della prima settimana fino al 7% della terza settimana per poi calare nella quarta e quinta settimana; contemporaneamente, dalla terza settimana cresce moltissimo l'interesse per la paglia (si passa da un 2% di soggetti intenti a mordere l'oggetto nelle prime due settimane ad un 10%) e tale interesse mantiene un trend crescente fino alla quinta settimana quando il numero totale di soggetti impegnati a masticarla raggiunge in media il 14%. Se consideriamo i comportamenti di esplorazione e mordere riferiti all'arricchimento catene si osserva un livello di interesse intermedio che si mantiene costante nell'arco delle cinque settimane: è più basso se si considerano corde e paglia, maggiore se si considera il tronchetto. La percentuale di soggetti che mordono le catene si colloca tra il 2% e il 5% a seconda della settimana considerata.

Il tronchetto invece non è particolarmente sfruttato: la percentuale di soggetti intenti a morderlo è sempre inferiore al 2% nell'arco di tutto l'esperimento (Fig. 2).

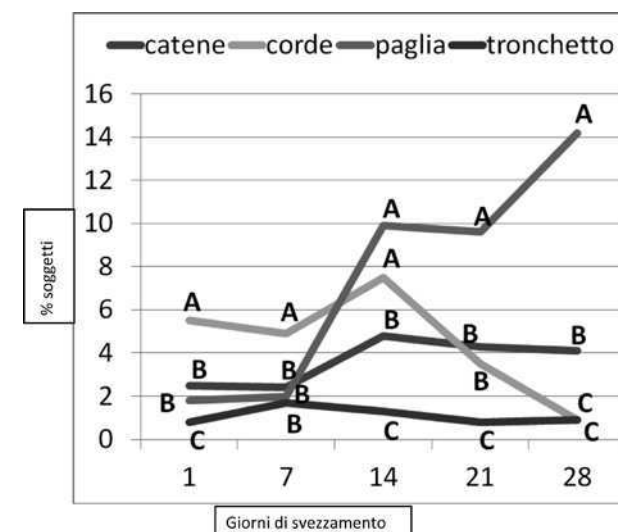


Figura 2 - Andamento nel corso dello svezzamento del comportamento mordere l'arricchimento ambientale.
Figure 2 - Development throughout weaning phase of biting towards the enrichment

Decubito

Nello studio è stato preso in considerazione anche il comportamento di decubito per avere indicazioni sullo stato di "tranquillità" dei suinetti (Fig. 3).

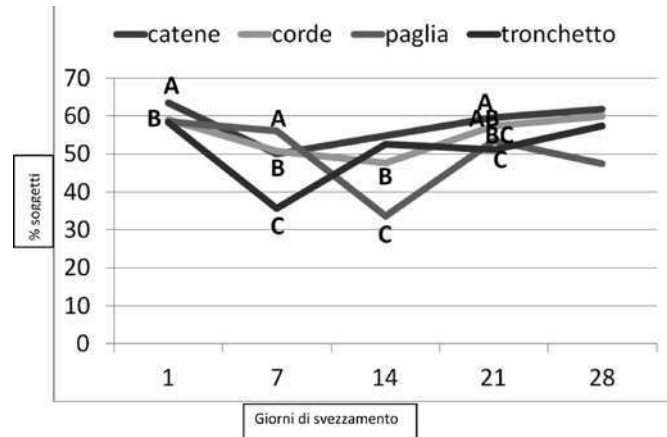


Figura 3 - Andamento nel corso dello svezzamento del comportamento di decubito.
Figure 3 - Development throughout weaning phase of lying behaviour

Presenza di animali in mangiatoia

Nell'arco delle cinque settimane la percentuale di soggetti presenti in mangiatoia è stata più elevata nei box dove era presente il tronchetto rispetto a tutti gli altri arricchimenti. Per questa tesi si sono raggiunti picchi del 20% di animali presenti in mangiatoia. Anche con le catene questa presenza è stata piuttosto elevata ma inferiore rispetto a quelli che usano il tronchetto (8 al 15%). Per quanto riguarda corde e paglia, le percentuali di accesso alla mangiatoia sono molto variabili a seconda della settimana in questione (Fig. 4).

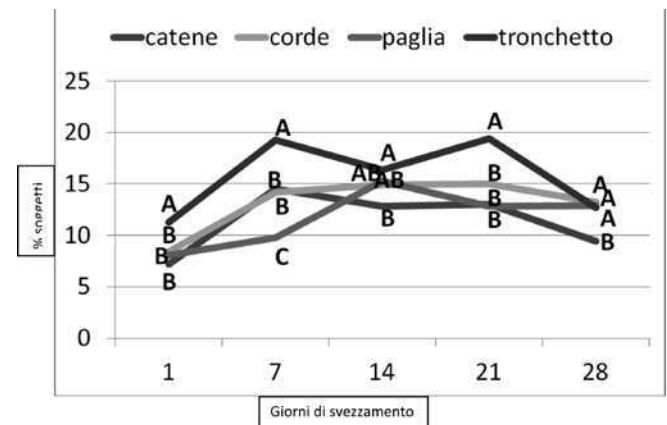


Figura 4 - Andamento nel corso dello svezzamento della presenza di animali in mangiatoia.
Figure 4 - Development throughout weaning phase of pigs at the trough

Conflitti

Differenze significative tra le tesi sono emerse alla seconda e alla terza settimana di osservazione. In particolare le attività conflittuali sono state più elevate nei box contenenti il tronchetto come arricchimento ambientale. Ad esempio facendo riferimento alla seconda settimana di osservazione la differenza è ben marcata: si passa da un 16% di soggetti coinvolti in conflitti nei box col tronchetto, ad un 7% di soggetti in quelli con la paglia, ad un 5% in quelli con le catene e ad un 2% in quelli con la corda (Fig. 5).

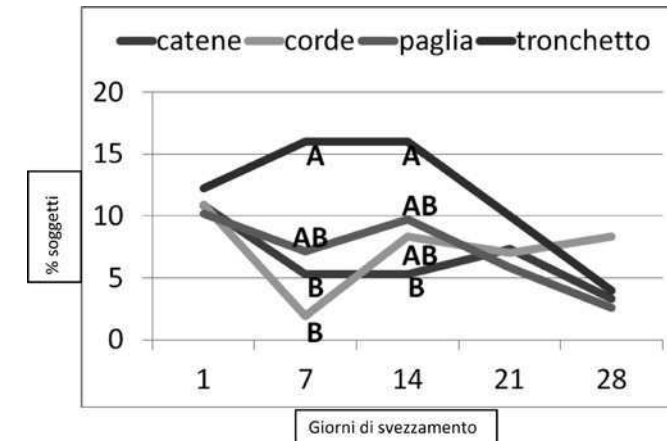


Figura 5 - Andamento dei conflitti nel corso dello svezzamento.
Figure 5 - Development of conflicts throughout weaning phase

Lesioni corporee

L'analisi dei dati raccolti ha evidenziato come le lesioni sono tendenzialmente maggiori nei box con le corde e con la paglia con differenze statisticamente significative nelle settimane uno, quattro e cinque (figure 6).

I punti che sembrano essere maggiormente interessati dalle lesioni sono le orecchie e il collo, colpiti in media rispettivamente per il 43,5% e per il 16,6% (Fig. 7). A seguire troviamo poi le lesioni al tronco e alla coscia, le lesioni alle spalle e infine le lesioni alla testa.

Nei grafici vengono inoltre riportate informazioni riguardanti la gravità delle lesioni: per quanto riguarda le lesioni alle orecchie e al collo ossia le parti maggiormente interessate dalle graffiature, si può notare come in entrambi i casi le ferite più gravi siano statisticamente più rilevanti nei box contenenti la paglia e le corde

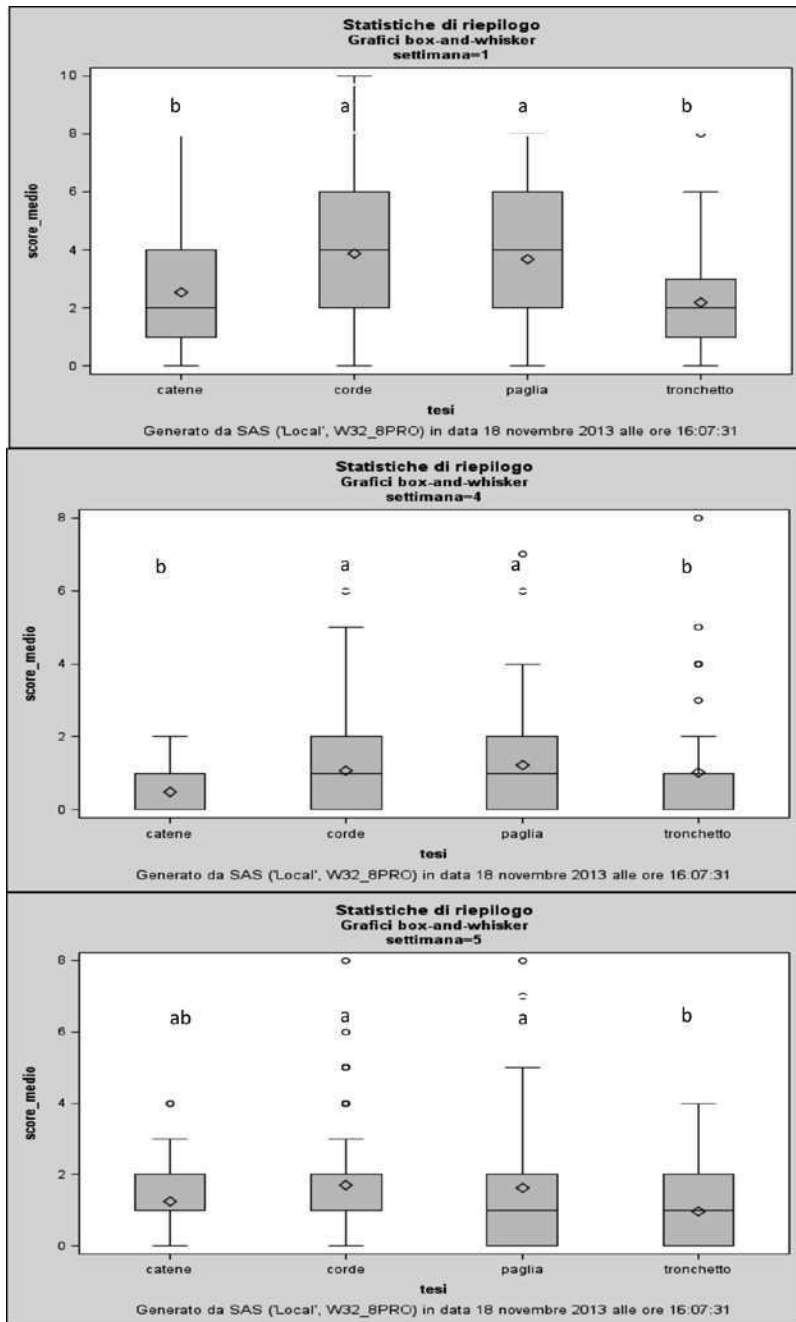


Figura 6 - Grafici box e whisker sulle lesioni, settimana 1-4-5
Figure 6 - Box and whisker on the lesions, week 1-4-5

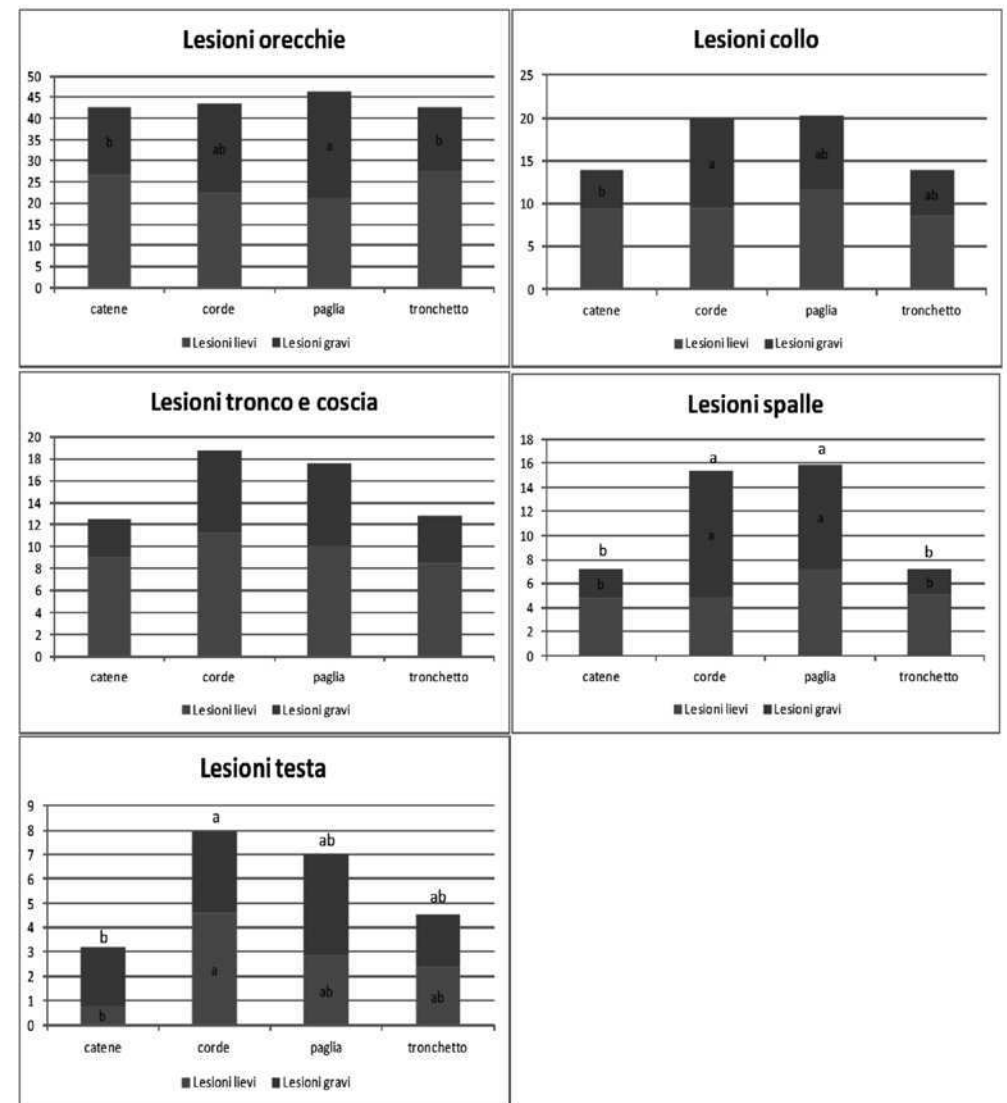


Figura 7 - Lesioni in diverse regioni del corpo
Figure 7 - Lesions in different areas of the body

DISCUSSIONE

Nelle prime due settimane gli animali indipendentemente dall'oggetto inserito nel box hanno mostrato una maggior tendenza ad annusare e leccare l'arricchimento, poi col passare del tempo questo comportamento è tendenzialmente diminuito: l'oggetto appena inserito nel box costituisce infatti una novità e l'animale prima di morderlo deve entrare in confidenza con lo stesso. Solo dopo che il suinetto ha studiato l'arricchimento al quale si trova di fronte, si avvicina con l'intento quasi esclusivo di morderlo.

Il calo di interesse per le corde che si osserva alla quarta e quinta settimana non è legato alla

riduzione di interesse verso l'oggetto ma piuttosto dal veloce consumo della corda stessa tale da richiedere la sua pressoché continua sostituzione. I suinetti infatti riuscivano a mordere le corde al punto di riuscire a ridurle a sottili filamenti per poi romperle e masticarle fino ad accorciarle. L'interesse per la paglia non sembra essere immediato ma è crescente nel corso dello svezzamento, probabilmente perché il substrato manipolabile. Dallo studio da noi effettuato emerge quindi che la paglia assume una rilevanza importante a partire dalla terza settimana, quando i suinetti l'annusano, la mordono, la buttano e terra per poi rimetterla in bocca: ciò indica che la paglia costituisce un ottimo arricchimento ambientale sia quando è messa a disposizione come lettiera sia quando è presente in forma lunga in ceste appese al muro e rappresenta un oggetto che ha la capacità di fornire uno sfogo per le attività di manipolazione. Questo risultato trova sostegno anche in bibliografia e quando la paglia è presente come lettiera determina sempre un miglioramento dello stato di benessere del suino favorendo la manifestazione di comportamenti positivi come masticare e giocare (De Jong et al, 1998).

Per le catene l'interesse espresso come comportamenti di esplorazione (masticare/leccare) è inferiore a quello espresso per paglia e corde. Questo è probabilmente dovuto al fatto che il suinetto può tenere in bocca le catene ed effettuare una certa attività di masticazione ma nettamente inferiore a quella di paglia e corde. Il tronchetto invece sembra motivare i suinetti a giocare più che a masticare e mordere. Infatti tra gli atteggiamenti riscontrati vi è quello di mettere il grugno sotto il tronchetto e sollevare lo stesso, oppure quello di mettere le zampe anteriori sopra il tronchetto per potersi dondolare.

Parallelamente all'aumentare dell'interesse dei suinetti per la paglia (partire dalla terza settimana), si assiste nei box con la paglia ad un decremento nella percentuale di soggetti in decubito: questo si spiega con il fatto che gli animali ricercano con foga l'arricchimento e sono più attivi e intenti in attività di manipolazione/esplorazione piuttosto che restare in decubito inattivi.

L'interesse per gli alimenti e l'area di alimentazione è maggiore se gli animali sono annoiati non potendo trovare stimoli alternativi. Nell'arco delle cinque settimane la percentuale di soggetti che sono alla mangiatoia è più elevata nei box dove è presente il tronchetto: gli animali non sono interessati a tale arricchimento ambientale come gli altri tre, risultano essere più annoiati e si recano più frequentemente alla mangiatoia.

Le lesioni in questo studio sono tendenzialmente maggiori nei box con le corde e con la paglia nella prima settimana di osservazione: ciò è indicativo del fatto che gli animali appena trasferiti nel nuovo ambiente devono stabilire una gerarchia sociale e per questo hanno una maggiore probabilità di presentare graffiature o ferite da morsicatura. Il fatto che siano gli animali dei box con la paglia e con le corde, i soggetti che riportano più ferite può essere una conseguenza della maggiore mole dei suinetti accasati in questi box. I suinetti inclusi nella ricerca erano infatti coetanei ma al momento dell'inizio della prova sono stati collocati nei diversi box in funzione del peso creando gruppi omogenei in base a questo parametro. È probabile che nei box con suinetti leggermente più pesanti (paglia e corde) la disponibilità di spazio per capo (pur nel rispetto delle norme sul benessere) possa essere diventata nel corso del tempo un fattore maggiormente limitante rispetto ad altre tesi. Non va esclusa tuttavia anche l'ipotesi che dato il maggior interesse per questi arricchimenti possa essersi creata una sorta di competizione per accedervi considerato anche il punto di accesso era unico.

In tutto lo studio invece non si sono mai evidenziati fenomeni di morsicatura della coda e questo potrebbe essere un fatto molto positivo e indicativo di uno stato di tranquillità generale degli animali.

Questo studio conferma quanto già illustrato in bibliografia ossia che l'arricchimento ambientale è fondamentale affinché il comportamento dei suini non degeneri in atteggiamenti aggressivi

e dannosi verso conspecifici in ambienti ipostimolanti (Grandin, 1989). Dal questo studio si evidenzia come la qualità dell'arricchimento non è ininfluente dato che le attività conflittuali nella seconda e terza settimana sono state più elevate nei box contenenti il tronchetto: questo è presente nel box ma poco sfruttato e gradito dal suino, tanto da coincidere con un ambiente ipostimolante.

La novità è un aspetto fondamentale di qualsiasi schema di arricchimento ambientale, specialmente per prevenire il fenomeno dell'adattamento. Nel nostro studio abbiamo mantenuto per tutta la durata dell'esperimento negli stessi box lo stesso tipo di arricchimento ambientale: nell'arco delle cinque settimane non sembra esserci stato un declino di interesse nei confronti di alcun oggetto. Ciò è vero escludendo l'arricchimento ambientale corde nel quale l'interesse sembra calare ma ricordiamo che queste nelle ultime settimane erano meno accessibili agli animali per un discorso legato al loro consumo.

CONCLUSIONI

Le corde molto gradite dai suinetti nelle prime settimane di svezzamento hanno l'inconveniente di essere distrutte in tempi rapidi: a partire dalla terza settimana la sostituzione diventa giornaliera. Utilizzare solo queste come arricchimento risulterebbe essere un'opzione poco pratica, per non parlare dei costi legati all'acquisto della corda. La soluzione migliore potrebbe essere quella di inserire nei box sia le corde che la paglia in modo da creare due poli di interesse all'interno del box o in alternativa fornire per le prime due settimane le corde per poi introdurre successivamente la paglia. Ciò permetterebbe di garantire il benessere animale legato alla presenza continua di un arricchimento ambientale gradito al suino e nello stesso tempo di ridurre l'impatto gestionale per l'allevatore che si traduce in un aumento dei costi e un maggiore impegno lavorativo.

Non c'è soluzione definitiva che elimini completamente i conflitti data la natura gerarchica di questa specie e i molteplici fattori coinvolti nell'espressione di tale atteggiamento. L'importante però è cercare di ridurre la frequenza con la quale tali comportamenti si manifestano e a tal fine è indispensabile l'utilizzo di una qualsiasi forma di arricchimento ambientale.

Risulta altrettanto importante limitare il problema frequente delle morsicature alla coda: per questo motivo i suinetti sono sottoposti all'età di 7 giorni al taglio preventivo della coda.

BIBLIOGRAFIA

- Bloomsmith, M. A., L. Y. Brent, and S. J. Schapiro (1991) "Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman primates". *Lab. Anim. Sci.* **41**, 372-377
- De Jong I. C. et al (1998) "Effects of strawbedding on physiological responses to stressors and behavior in growing pigs". *Physiol Behav.* **64**(3), 303-10
- Fraser D. (1975) "The effect of straw on the behavior of sows in tether stalls". *Animal Production* **21**, 59-68
- Grandin T. (1989) "Effect of rearing environment and environmental enrichment on the behaviour of neural development of young pigs". *Doctoral Dissertation University of Illinois*
- Hughes BO. (1976) "Preference decisions of domestic hens for wire or litter floors". *Appl. Anim. Ethol.* **2**, 155-165
- Mason, GJ. (1991) "Stereotypies: a critical review". *Animal Behaviour* **41**, 101-103
- Newberry, R. C. (1995) "Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments". *Appl. Anim. Behav. Sci.* **44**, 229-243

**STUDIO BASELINE SULLA QUALITÀ MICROBIOLOGICA
E CHIMICO-FISICA DELL'ACQUA DI ABBEVERATA IN
ALLEVAMENTI SUINI IN VENETO**

***MICROBIOLOGICAL AND CHEMICAL-PHYSICAL QUALITY
OF WELL WATER IN SWINE FARMS: A BASELINE SURVEY IN
VENETO***

GIACOMELLI M.¹, DRIGO M.², PASOTTO D.², PICCIRILLO A.¹, MENANDRO ML.²,
RIBAUDO G.³, ZAGOTTO G.³ e MONTESISSA C.¹

¹*Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA),
Università degli Studi di Padova;*

²*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS),
Università degli Studi di Padova;*

³*Dipartimento Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche,
Università degli Studi di Padova.*

Parole chiave: acqua di abbeverata, qualità chimico-fisica, qualità microbiologica

Keywords: animal watering, chemical-physical quality, microbiological quality

Riassunto

L'acqua è uno dei nutrienti fondamentali e frequentemente per l'abbeverata degli animali viene impiegata acqua di pozzo. Mentre i parametri di qualità dell'acqua per il consumo umano sono strettamente regolati, non esistono specifici requisiti biologici e chimico-fisici per le acque utilizzate per l'abbeverata in allevamento. Per questo motivo è stato condotto in 20 aziende suinicole della Regione del Veneto uno studio *baseline* di valutazione della qualità microbiologica e chimico-fisica dell'acqua utilizzata in allevamento. I campioni sono stati raccolti due volte in un anno, in estate ed inverno, in 3 punti differenti del sistema di distribuzione. Ogni campione è stato analizzato per durezza, contenuto ammoniacale, sostanze organiche complessivamente disciolte e quantificazione degli anioni e cationi. La carica batterica totale a 22 °C e 37 °C, presenza e numerazione di *Enterococcus* spp. e *E. coli*, e la presenza di *Campylobacter* spp. sono stati i parametri microbiologici valutati. La qualità chimico-fisica dell'acqua di abbeverata è risultata frequentemente entro i limiti richiesti per l'acqua potabile. Anche la qualità microbiologica è risultata complessivamente di alto livello al pozzo, con contaminazioni contenute a livello del punto di abbeverata. Questi risultati serviranno per altri studi rivolti a determinare la solubilità e stabilità di farmaci somministrati tramite l'acqua di abbeverata per comprendere l'influenza della sua qualità quando usata come veicolo di medicazione.

Abstract

Water is an essential nutrient for livestock and groundwater is frequently used for animal watering. While the quality of water for human consumption is strictly regulated, no specific requirements exist regarding biological, chemical and physical parameters of water for livestock supply. Therefore, a baseline study involving 20 swine farms was conducted in the Veneto Region to evaluate some chemical, physical and microbiological properties of drinking water for livestock. Water samples were collected 2 times per year, in summer and winter, at 3 different points of the water distribution system. Each sample was evaluated for water hardness, ammonia content and organic and inorganic oxygen demand. Cationic and anionic species were also quantified. Total

bacterial count at 22 °C and 37 °C, presence and enumeration of *Enterococcus* spp. and *E. coli*, and presence of *Campylobacter* spp. were evaluated as microbiological parameters. Results of chemical and physical analyses showed that the quality profile of water for livestock consumption is frequently within the limit of tap water for human use. Similarly, the microbiological quality of well water was found to be high, with limited contaminations detected in samples collected from the nipples. These findings lay the foundations for further studies aimed at determining the solubility and stability of drugs delivered to livestock via medicated water, to understand the influence of water quality when used as medication vehicle.

INTRODUZIONE

In seguito alla recente normativa sul benessere animale, l'acqua di abbeverata degli animali in allevamento dovrebbe essere monitorata sia per assicurarne la disponibilità, sia per garantirne la qualità, prerequisito della salute e del benessere degli animali allevati. Per diversi motivi, non ultimi quelli economici, molti allevamenti suinicoli si riforniscono tramite pozzi da acqua di falda e pochi sono quelli allacciati alla rete idrica. L'acqua destinata all'abbeverata deve comunque essere di buona qualità (D.lgs. 53/2004), perché in caso contrario acque non idonee possono comportare problemi sanitari, riduzione delle prestazioni produttive, alterazione della qualità dei prodotti e danni alle attrezzature (Enne *et al.*, 2006). Negli ultimi anni è stato fatto uno sforzo notevole per migliorare il controllo dei contaminanti chimici e biologici nell'alimentazione animale, ma resta una sostanziale carenza scientifica riguardo le contaminazioni dell'acqua di abbeverata che può essere un importante veicolo di tossici agli animali e di conseguenza agli alimenti da essi prodotti. I batteri presenti nei reflui degli allevamenti possono contaminare le acque di superficie allo stesso modo dei residui di pesticidi utilizzati come fitofarmaci nelle coltivazioni adiacenti gli allevamenti (Rossi e Gastaldo, 2005).

Sebbene in UE non siano previste norme specifiche relative alle caratteristiche di qualità dell'acqua di bevanda degli animali, la Direttiva 98/58/EC stabiliva, già dal 1998, che a tutti gli animali allevati dovesse essere garantita acqua di qualità (Enne *et al.*, 2006). In Italia, le caratteristiche di qualità dell'acqua per animali vengono riferite a quelle riportate nel D.lgs. 31/2001 che regola le acque per uso umano e riporta le specifiche di "indicatori" quali colore, odore, sapore, torbidità, durezza, ma anche numerosi altri parametri microbiologici e chimici. Un'acqua di qualità è quindi un requisito fondamentale e non va dimenticato che in alcune tipologie di allevamento, compreso quello suinicolo, l'acqua gioca un ruolo importante quale veicolo per la medicazione degli animali. L'alterazione dei parametri chimico-fisici e microbiologici può influenzare la solubilità e la stabilità in soluzione dei farmaci impiegati e quindi l'efficacia della terapia (Enne *et al.*, 2006). Per questo motivo, nell'ambito di un progetto finanziato dall'Ateneo di Padova nel 2011 (Prot. CPDA113807), con lo scopo di monitorare la qualità dell'acqua di pozzo in almeno 20 allevamenti suinicoli del Veneto, oltre alla durezza, al pH e alla salinità dell'acqua, sono stati valutati numerosi parametri chimici, tra cui la presenza di anioni indici di inquinamento agricolo quali nitrati e solfati, quella di cationi indicatori di inquinamento industriale quali cadmio, piombo e arsenico e infine di materiale organico disciolto che insieme ai cationi può interferire anche con la solubilità dei farmaci e la loro stabilità in soluzione (Bonato, 2007). È stata valutata anche la qualità microbiologica dell'acqua analizzando i seguenti parametri: cariche batteriche totali a 22 °C e 37 °C e presenza ed enumerazione di *E. coli* ed enterococchi quali indicatori di inquinamento fecale. Il conteggio delle colonie batteriche a 22 °C è un indicatore di scarso significato sanitario, ma è utile per valutare l'efficacia del trattamento dell'acqua, o per valutare la pulizia e l'integrità del sistema di distribuzione. Un incremento nel conteggio delle colonie batteriche a 37 °C può rappresentare un segnale precoce d'inquinamento antropico e la loro presenza cospicua può essere responsabile

di malattie come gastroenteriti e infezioni della cute e delle mucose, particolarmente in animali con compromissione del sistema immunitario (Bonato, 2007). Infine, poiché i suini sono un *reservoir* di batteri del genere *Campylobacter*, in particolare di *C. coli* ma anche di *C. jejuni*, con prevalenze comprese tra il 50% e il 100% (Weijtens *et al.*, 1997; Fosse *et al.*, 2008; EFSA-ECDC, 2013) e poiché *Campylobacter* è considerato tra i maggiori rischi biologici trasmissibili ai consumatori tramite la carne suina (Fosse *et al.*, 2008), oltre ai classici parametri microbiologici è stato valutato il ruolo dell'acqua di abbeverata quale fonte di infezione da *Campylobacter* anche per l'allevamento suino. Gli studi svolti al riguardo nei suini sono molto scarsi, ma l'infezione degli animali sembra avvenire per via orizzontale dall'ambiente di allevamento (Weijtens *et al.*, 2000) e la somministrazione di acqua di pozzo contaminata è stata implicata nell'introduzione di *Campylobacter* in allevamenti avicoli (Zimmer *et al.*, 2003; Pérez-Boto *et al.*, 2010).

MATERIALI E METODI

Campionamento: allo studio hanno partecipato 20 allevamenti di suini della Regione del Veneto (province di Padova, Treviso, Vicenza e Verona), riforniti con acqua di pozzo quale unica fonte per l'abbeverata degli animali. In ogni azienda sono stati raccolti campioni di acqua in tre punti: dal pozzo (punto A), da un punto intermedio della linea di distribuzione, solitamente in corrispondenza di un sistema di medicazione dell'acqua se già presente, o comunque in un punto adatto alla sua installazione (punto B) e dal punto di abbeverata (punto C). I campionamenti sono stati svolti due volte nell'anno solare 2012, in corrispondenza della stagione estiva e di quella invernale. Tutti i campioni sono stati prelevati in contenitori sterili e trasportati al laboratorio a temperatura di refrigerazione e immediatamente processati per l'analisi microbiologica, conservati in frigo e processati entro 48 ore per le analisi chimico-fisiche.

Esami microbiologici: le analisi microbiologiche sono state compiute su campioni da un litro di acqua, prelevati nel punto A e nel punto C, sottoposti ad analisi per la definizione della carica batterica totale a 22 °C e a 37 °C; inoltre, è stata effettuata la ricerca e numerazione di *Enterococcus* spp. e di *E. coli*. Non esistendo una normativa specifica per le acque di abbeverata, nel presente lavoro si è scelto di effettuare le analisi nel rispetto delle procedure ISO stabilite dalla Direttiva Europea 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano e recepite in Italia dal D.Lgs. n. 31/01 (rispettivamente ISO 6222, ISO 7899-2 e ISO 9308-1). Per la preparazione delle diluizioni decimali seriali utilizzate per la determinazione della carica microbica totale a 22 °C e a 37 °C si è fatto riferimento all'ISO 6887-1, mentre per l'applicazione pratica della tecnica delle membrane filtranti si è fatto riferimento alla procedura dettata dall'ISO 8199.

Ricerca di *Campylobacter* spp.: la ricerca di *Campylobacter* spp. è stata svolta in campioni di 2 litri di acqua prelevati ai punti A e C. Ciascun campione, diviso in due aliquote da 1 litro, è stato analizzato con due diverse metodiche per il rilievo di *Campylobacter* spp.: isolamento in coltura e *real-time* PCR.

Per l'isolamento in coltura di *Campylobacter* spp. i campioni sono stati processati seguendo i principi della metodica standard per il rilievo di *Campylobacter* termotolleranti dall'acqua (ISO 17995), alla quale sono state apportate lievi modifiche (SCA, 2002; Williams *et al.*, 2012). I campioni di acqua sono stati sottoposti a filtrazione attraverso una membrana sterile con pori del diametro di 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Germania) tramite un sistema di pompa a vuoto. Successivamente, ciascuna membrana singolarmente è stata inoculata in 50 ml di brodo di arricchimento selettivo Exeter (Mast Diagnostics, Merseyside, UK), e il campione ottenuto incubato a 41,5 °C in condizioni di microaerofilia. Dopo 48 ore di incubazione, un'aliquota (200 µl) di ciascuna brodocoltura è stata seminata su Karmali agar (OXOID, Basingstoke, UK),

previa filtrazione passiva secondo la procedura descritta da Giacomelli *et al.* (2012). Le piastre sono state incubate per 48 ore a 41,5 °C in microaerofilia e quindi esaminate per la ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. Le colonie sospette sono state sottoposte a *multiplex end-point* PCR per l'identificazione di genere e specie, secondo il protocollo di Yamazaki-Matsune *et al.* (2007).

Per la *real-time* PCR ciascuna aliquota è stata filtrata attraverso membrane sterili con pori del diametro di 0,2 µm (Sartorius). I filtri sono stati posti in provette con 5 ml di acqua deionizzata sterile e agitati vigorosamente. Un'aliquota di 3 ml della soluzione così ottenuta è stata centrifugata a 5.000 rpm per 10 minuti, mentre i rimanenti 2 ml sono stati conservati a -20 °C. Il pellet è stato risospeso in 200 µl di PBS e sottoposto a estrazione del DNA utilizzando l'High Pure Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Il DNA estratto è stato sottoposto a un saggio di *multiplex real-time* PCR con sonde Taqman® e primer specifici per *C. jejuni* e *C. coli*, come descritto da Toplak *et al.* (2012).

Analisi chimico/fisiche: al momento del prelievo dal pozzo per ogni campione è stata registrata la profondità del pozzo di prelievo, la temperatura dell'acqua, il pH, la conducibilità e la salinità mediante sonda YSI Model 85 (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA). Tutti i campioni prelevati sono stati sottoposti ad analisi con il metodo di Kubel per la valutazione delle sostanze organiche complessivamente disciolte, con il metodo di Nessler per titolare l'Ammoniaca, mediante cromatografia ionica per determinare gli anioni Cloruri, Nitriti, Nitrati, Fosfati, Solfati (LOQ 0,1 mg/L) e con spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP) per la valutazione di Alluminio, Arsenico, Boro, Bario, Calcio, Cadmio, Cobalto, Cromo, Rame, Ferro, Potassio, Magnesio, Manganese, Molibdeno, Sodio, Nichel, Piombo, Antimonio, Selenio, Silicio, Titanio, Vanadio, Piombo, Stagno, Zolfo, Mercurio, Zinco (LOQ 0,01 mg/L). La modalità di trattamento dei campioni e tutti i metodi analitici riportati per il controllo dei parametri di qualità chimici sono conformi a quanto riportato dal D.lgs. 152/2006 (Istituto Superiore di Sanità, 2007).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Parametri microbiologici: la carica batterica totale a 37 °C e 22 °C rilevata ai punti A ha dimostrato valori quasi sempre più bassi dei valori limite stabiliti per l'acqua potabile a uso umano (rispettivamente < 20ufc/ml e < 100 ufc/ml). Nei punti C invece si sono rilevati frequentemente valori superiori a tale limite e più elevati nei campionamenti estivi rispetto a quelli invernali. In tutti i campionamenti effettuati è stato riscontrato solo un caso di presenza sia di enterococchi che di *E. coli* al punto A. Questa non conformità, indice di inquinamento fecale, è stata registrata in inverno in un contesto caratterizzato da intensa piovosità nel periodo precedente il campionamento che, associato all'orografia del territorio, ha comportato un inquinamento della falda che ha imposto inoltre un'ordinanza comunale di divieto dell'uso dell'acqua della falda per il consumo umano. Va segnalato inoltre che la profondità del pozzo era attorno ai 50 metri; le misure non conformi rispetto ai limiti di riferimento si sono registrate nei pozzi più superficiali ovvero entro i 60 metri di profondità (Figura 1).

Ricerca di *Campylobacter* spp.: entrambe le metodiche utilizzate hanno rilevato *Campylobacter* raramente. In particolare, nella stagione estiva il microrganismo è stato riscontrato soltanto nel campione prelevato al punto C dell'allevamento VR17, dal quale sono stati isolati ceppi di *C. coli*, mentre la *real-time* PCR ha rilevato la presenza contemporanea di *C. coli* e *C. jejuni* nello stesso campione. Un numero maggiore, seppur limitato, di positività è stato invece riscontrato nella stagione invernale, con differenze tra l'esito dell'isolamento in coltura e della *real-time* PCR. La prima metodica ha rilevato tre campioni positivi in due allevamenti (punto C dell'allevamento

PD08, entrambi i punti nell'allevamento TV10), con isolamento di microrganismi appartenenti alla specie *C. coli*. La *real-time* PCR invece ha confermato la positività dell'allevamento TV10 ed ha rilevato *Campylobacter* in ulteriori 10 campioni di acqua provenienti da 6 aziende: punto A dell'allevamento VR17, entrambi i punti di prelievo negli allevamenti VI12, TV13, TV18, TV19, e punto C dell'allevamento TV11. Nello specifico, negli allevamenti TV10, TV11, VI12, TV13 e al punto A di TV19 è stato rilevato solo *C. coli*, mentre negli altri campioni positivi sono stati riscontrati sia *C. jejuni*, sia *C. coli*. La scarsa frequenza con la quale *Campylobacter* è stato riscontrato nell'acqua di abbeverata suggerisce che questa non sia un'importante fonte d'introduzione di questo microrganismo negli allevamenti suinicoli. In particolare, *Campylobacter* è stato isolato molto raramente in coltura, mentre un numero maggiore di positività è stato rilevato dall'analisi in *real-time* PCR. Questo riscontro evidenzia il noto limite delle metodiche di isolamento di *Campylobacter* dall'acqua, che possono esitare in sottostima della presenza del microrganismo e risultati falsamente negativi. Ciò dipende dall'estrema suscettibilità di *Campylobacter*, la cui vitalità, e di conseguenza possibilità di isolamento in coltura, si riduce rapidamente in seguito a variazioni anche minime delle condizioni chimico-fisiche del substrato nel quale si trova. Inoltre, nell'acqua *Campylobacter* può essere presente anche nella cosiddetta forma "vitale ma non coltivabile" (*viable but not-culturable*, VBNC), la quale comporta dei cambiamenti fisiologici e morfologici che gli permettono di sopravvivere anche in condizioni avverse (Rollins e Colwell, 1986) e che non è rilevabile tramite coltura batterica. Per questi motivi, nel presente studio si è scelto di sommare alla procedura di isolamento in coltura una metodica di biologia molecolare quale la *real-time* PCR, la quale, avendo come target in DNA del microrganismo, è in grado di rilevarne la presenza anche in condizioni di non coltivabilità. I risultati ottenuti confermano l'importanza dell'impiego di metodiche alternative a quelle classiche per la ricerca di *Campylobacter* nell'acqua.

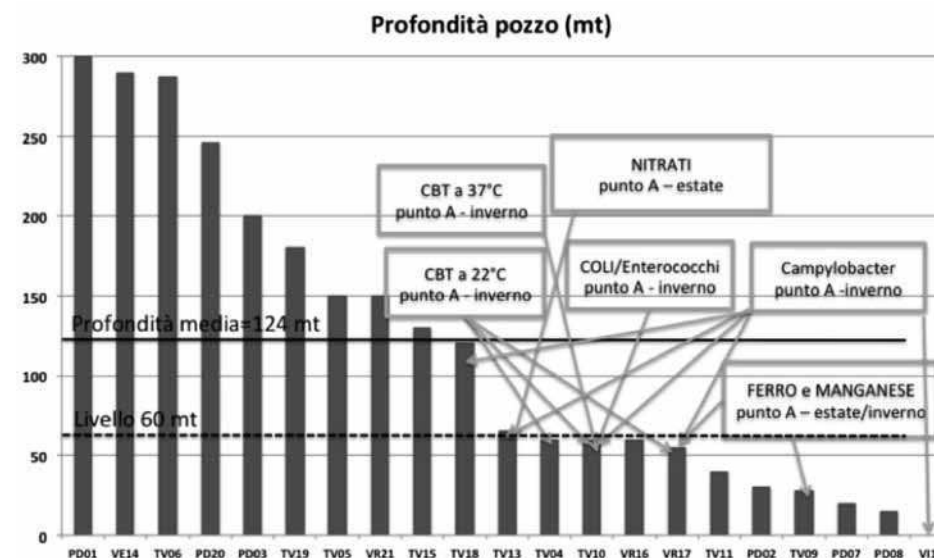


Figura 1. Profondità dei pozzi e parametri superiori al limite di riferimento al punto A.
Figure 1. Depth of wells and parameters higher than reference limit at point A.

Analisi chimico/fisiche: le tecniche analitiche adottate ci hanno permesso di indagare e quantificare, per i 120 campioni di acqua prelevati dagli allevamenti suini, in estate ed in inverno, le concentrazioni di NH₃ e di sostanza organica disciolta, di Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Si, Ti, V, P, S, Sn, Hg, Zn, come degli anioni Cl⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻. Complessivamente sono stati registrati solo 30 risultati anomali su 4500 dati analitici.

La salinità è un parametro molto importante da considerare per l'abbeverata degli animali; essa è equivalente ai solidi totali disciolti (STD), i quali vengono espressi come milligrammi di residuo fisso per litro di acqua dopo essiccamento a 180 °C. I campioni di acqua prelevati dai 20 pozzi presentavano una *range* di salinità compreso tra 200 mg/L e 400 mg/L. Questi sono considerati valori limite per l'acqua di bevanda, anche se i primi effetti negativi sull'organismo sono evidenti con STD superiore a 3.000 mg/l (Rossi e Gastaldo, 2005; Enne *et al.*, 2006).

Con l'eccezione di PD20 e TV09, tutti i campioni al punto A presentavano una durezza (contenuto di sali di calcio, magnesio e ioni disciolti come carbonati, bicarbonati, solfati, nitrati e cloruri) compresa tra 30 °F e 50 °F, pari a un contenuto di 300-500 mg/l di CaCO₃. In funzione anche di altri fattori, come il pH e la presenza di bicarbonato, l'acqua con una durezza superiore a 200 mg/l può causare depositi e incrostazioni di carbonato di calcio nei sistemi di distribuzione e sulle superfici di contatto, e interferire con la dissoluzione e l'assorbimento di Tetracicline (Enne *et al.*, 2006; Bonato, 2007).

Per quanto riguarda il pH, tutti i campioni al punto A rientravano in un *range* di accettabilità, pari a valori compresi fra 6,5 e 8,5. In generale acque con pH al di fuori di questo *range* possono contribuire a una scadente conversione dell'alimento e a una minore ingestione di acqua e alimento, all'insorgenza di turbe del metabolismo e della fertilità, diarrea, oltre alla precipitazione di alcuni farmaci somministrati con l'acqua, con possibilità di tempi di sospensione prolungati e di presenza di residui di medicinali nelle carcasse (Rossi e Gastaldo, 2005; Enne *et al.*, 2006). Inoltre, anche se il pH è soltanto uno dei vari fattori che determinano il grado di corrosione, in generale più basso è il pH, più alta è la capacità di corrosione dell'acqua. Acque particolarmente acide (pH < 5-5,5) possono provocare negli animali problemi all'apparato urinario e digestivo, fenomeni di demineralizzazione e fragilità scheletrica e corrosione dei materiali dei tubi di trasporto (Enne *et al.*, 2006).

La positività per ammoniaca è stata rilevata in un solo campione (TV09, punto C), che presentava anche una quantità elevata di materia organica, dati spesso correlati alla contaminazione da allevamenti intensivi. Tuttavia, una contaminazione con ammoniaca può anche derivare da impianti e condutture di cemento (per rilascio), oppure può essere una conseguenza della disinfezione con clorammina o dell'acidificazione dell'acqua di bevanda (Bonato, 2007).

In 2 allevamenti (TV04 e VR17) i campioni al punto A presentano valori di ferro > 1mg/l e di manganese > 0,05mg/l, il primo nel solo periodo invernale, mentre il secondo in entrambe le stagioni. Il ferro è un contaminante naturale, ma in genere la sua concentrazione non supera gli 0,3 mg/l. In conseguenza al suo impiego come coagulante (per depurazione di acqua) il ferro può aumentare nell'acqua trattata e distribuita, così come in seguito al suo rilascio dalle tubature dei sistemi di distribuzione per corrosione delle stesse (TV09 e TV03, punto C). Concentrazioni superiori a 2 mg/l possono ridurre il flusso idrico nelle tubature per fenomeni di flocculazione e accelerare il processo di degradazione di antibatterici come gli Aminoglicosidi; mentre a 5 mg/l il ferro può inattivare le Tetracicline (Bonato, 2007). Il manganese si trova naturalmente in molte fonti d'acqua superficiali e profonde, in sospensione o disciolto, con concentrazioni che variano da 0,001 a 0,6

mg/l. A concentrazioni superiori a 0,1 mg/l (TV04, TV05 e VR17, punto A) il manganese conferisce all'acqua un sapore sgradevole, mentre a partire dalla concentrazione di 0,02 mg/l può dar luogo alla formazione di depositi scuri nelle condutture e alterare la colorazione dell'acqua. Inoltre, in presenza di microrganismi in grado di concentrare il manganese, possono insorgere problemi di sapore, odore e torbidità dell'acqua di bevanda (Bonato, 2007).

Nelle acque superficiali la concentrazione di nitrati (NO₃⁻) è in genere ridotta (0-18 mg/l), ma può raggiungere livelli più elevati in caso di contaminazione con acque di dilavamento di discariche di rifiuti, o con reflui di origine agricola, umana, animale e industriale. Le concentrazioni fluttuano con andamento stagionale e possono aumentare quando nei fiumi vengono fatte confluire acque ricche di nitrati (Bonato, 2007). Nel periodo estivo due campioni (TV05 e TV13) al punto A e ben tre (PD02, PD03, TV10) al punto B presentavano concentrazioni tra 80 e 100 mg/l, ben superiori al limite di legge (50 mg/l), ma molto al disotto dei valori di tossicità riportati per le specie allevate. La presenza di attività agricole può causare facilmente un aumento della quantità di nitrati fino a raggiungere diverse centinaia di mg/l. Infatti, l'incremento nell'uso di fertilizzanti, la produzione e lo smaltimento dei reflui animali e i cambiamenti nell'uso del territorio rappresentano i principali fattori responsabili del progressivo aumento dei livelli di nitrati nelle acque (Bonato, 2007). Anche se i suini sono relativamente tolleranti a questi composti, nitrati in concentrazione superiore a 300 mg/l possono causare tossicità nei suinetti (Rossi e Gastaldo, 2005). Nelle acque sotterranee in genere la concentrazione di nitrati è intorno a 4-9 mg/l e per i nitriti è 0,3 mg/l e tale concentrazione dipende in larga misura dal tipo di suolo e dalla situazione geologica; Spesso i livelli di nitrato/nitrito nelle acque profonde sono più elevati di quelli delle acque superficiali: le condizioni anaerobiche comportano la riduzione del nitrato a nitrito e la sua conseguente persistenza, mentre la formazione di nitriti nelle acque distribuite e cariche di nitrati deriva dall'attività microbica ed è intermittente (Rossi e Gastaldo, 2005). Nei campioni di acqua saggiati la presenza di nitriti è risultata nei limiti previsti per legge.

Per quanto riguarda l'arsenico, nelle acque naturali esso è generalmente presente a concentrazione variabile da 0,001 a 0,002 mg/l, ma in alcune aree i livelli possono essere naturalmente più elevati. L'arsenico raggiunge le fonti d'acqua (anche quelle profonde) principalmente per dissoluzione dai minerali e dalle rocce, ma anche dai reflui industriali e per deposizione atmosferica (Bonato, 2007). In tutti i campioni testati nel presente studio l'arsenico era al di sotto del limite di legge di 0,01 mg/l.

CONCLUSIONI

Complessivamente i dati chimico-fisici e microbiologici mostrano che le maggiori contaminazioni sono presenti nei pozzi più superficiali (entro i 60 metri di profondità) e, seppur con qualche eccezione, i dati sono abbastanza incoraggianti, poiché le acque dei pozzi campionati mostrano profili di qualità sovrapponibili a quelli dell'acqua per l'uso umano.

Nella seconda parte del progetto, ora in corso, si vuole valutare, con il contributo di tecniche quali HPLC, LC-MS ed NMR, la solubilità e la stabilità, dopo dissoluzione nei campioni dei pozzi con acqua "peggiore", di alcuni antibatterici scelti tra quelli più spesso impiegati negli allevamenti suini per la medicazione dell'acqua. Le caratteristiche chimico-fisiche acquistano primaria importanza quando si devono considerare trattamenti via acqua medicata con farmaci in soluzione nell'acqua di bevanda. I parametri chimico-

fisici condizionano proprietà quali velocità di dissoluzione, solubilità e stabilità del farmaco, con ricadute sulla biodisponibilità dei medicinali veterinari. Aminoglicosidi, Tetracicline, Macrolidi, Sulfamidici e Beta-lattamine in soluzione possono essere particolarmente sensibili alle alterazioni del pH, alla presenza di inquinanti come metalli, sostanze organiche e anche ai batteri se presenti in grandi quantità. Per questo motivo i dati di solubilità e stabilità, ottenuti nelle condizioni di “scenario peggiore”, ci permetteranno di valutare la reale biodisponibilità dei preparati veterinari autorizzati in suinicoltura per acqua medicata, allo scopo di fornire informazioni per un corretto dosaggio dei farmaci con gli evidenti conseguenti benefici di salute per l’animale, per l’uomo e per l’ambiente.

BIBLIOGRAFIA

- Bonato A. (2007) “Acqua e salute - Indicazioni tratte dalle linee guida dell’OMS sulla qualità dell’acqua destinata al consumo umano”. A cura della Regione del Veneto. www.regione.veneto.it
- Enne G., Greppi G., Serratori M. (2006) “Il ruolo dell’acqua nell’allevamento animale”. *Italian J Agron.* 3, 519-527.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2013) “The European Union summary report on trend and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011”. *EFSA Journal.* 11, 3129.
- Fosse J., Seegers H., Magras C. (2008) “Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe”. *Vet Res.* 39, 1.
- Giacomelli M., Andrighetto C., Lombardi A., Martini M., Piccirillo A. (2012) “A longitudinal study on thermophilic *Campylobacter* spp. in commercial turkey flocks in Northern Italy: occurrence and genetic diversity”. *Avian Dis.* 56, 693-700.
- Istituto Superiore di Sanità (2007) “Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi chimici”. *Rapporti ISTISAN 07/31.* <http://www.iss.it/binary/aqua/cont/Rapp%20Ist%2007%2031.1193412143.pdf>
- Pérez-Boto D., García-Pena F.J., Abad-Moreno J.C., Hurtado-Pizarro M.D., Pérez-Cobo I., Echeita M.A. (2010) “Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders”. *Avian Pathol.* 39: 483-487.
- Rollins D.M., Colwell R.R. (1986) “Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment”. *Appl Environ Microbiol.* 52, 531-538.
- Rossi P., Gastaldo A. (2005) “Un’abbeverata di qualità per animali in perfetta salute”. *Agricoltura.* Luglio/agosto, 141-143.
- Standing Committee of Analysts (2002) “The microbiology of drinking water – part 10 – Methods for the isolation of *Yersinia*, *Vibrio* and *Campylobacter* by selective enrichment”, Nottingham, UK, The Environment Agency. <http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/mdwpart10.pdf>
- Toplak N., Kovač M., Piskernik S., Možina S.S., Jeršek B. (2012) “Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR”. *J Appl Microbiol.* 112,752-764.
- Weijtens M.J., van der Plas J., Bijker P.G., Urlings H.A., Koster D., van Logtestijn J.G., Huis in’t Veld J.H. (1997) “The transmission of campylobacter in piggeries; an epidemiological study”. *J Appl Microbiol.* 83, 693-698.
- Weijtens M.J., Urlings H.A., Van der Plas J. (2000) “Establishing a campylobacter-free pig population through a top-down approach”. *Lett Appl Microbiol.* 30, 479-484.
- Williams L.K., Sait L.C., Cogan T.A., Jørgensen F., Grogono-Thomas R., Humphrey T.J. (2012) “Enrichment culture can bias the isolation of *Campylobacter* subtypes”. *Epidemiol Infect.* 140:1227-1235.
- Yamazaki-Matsune W., Taguchi M., Seto K., Kawahara R., Kawatsu K., Kumeda Y., Kitazato M., Nukina M., Misawa N., Tsukamoto T. (2007) “Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*”. *J Med Microbiol.* 56, 1467-1473.
- Zimmer M., Barnhart H., Idris U., Lee M.D. (2003) “Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens”. *Avian Dis.* 47, 101-107.

DESCRIZIONE DI UN CASO DI VAGINITE INFETTIVA NELLE SCROFE

DESCRIPTION OF A REPORT CASE OF INFECTIVE VAGINITIS IN SOWS

SALVINI, F.*, GUADAGNINI, G.*, BRESAOLA, M.*, MAZZONI, C.°, SCOLLO, A°

* *Pig Vet, Brescia*
° *Suivet*

Parole chiave: Vaginite infettiva, parto

Key words: Infective vaginitis, farrowing

Riassunto:

Il presente lavoro descrive un caso clinico di vaginite infettiva in un allevamento di scrofe in provincia di Brescia. Il problema è iniziato a fine agosto 2013 con 2 scrofe che presentavano al parto una totale occlusione del canale del parto, tale da impedire la regolare espulsione dei suinetti. Nelle settimane successive il fenomeno è peggiorato interessando 80 scrofe in un periodo di tempo di circa 3 mesi. Una analisi anamnestica del caso, non ha permesso di mettere in evidenza pratiche errate nella fase del parto o della fecondazione. Le analisi di laboratorio, hanno messo in evidenza una endometrite necrotico purulenta a livello vaginale, con presenza di flora microbica polimorfa e Streptococco spp. Dopo circa 3 mesi dalla comparsa dei primi casi e dopo ripetuti trattamenti antibiotici di massa, non si sono più osservati casi clinici.

Summary:

The following work describes a clinical case of infective vaginitis in a sows' herd in the proximity of Brescia. The initial problem started at the end of August 2013, with 2 sows which presented during the farrowing a total occlusion of the farrowing canal, such that the regular expulsion of the piglets was obstructed. In the following weeks the phenomenon got worse, affecting 80 sows in a period of about 3 months. An amnestic analysis of the case didn't underline the wrong practices in the farrowing period or in the mating period. The laboratory analysis highlighted a necrotic purulent endometritis in vaginal, with the presence of microbial flora polymorphic and streptococcus spp. After about 3 months from the appearance of the firsts cases and after repeated antibiotic treatments, there have not been reported clinical cases anymore.

INTRODUZIONE:

Viene riportata la descrizione di un caso di infezione batterica a livello vaginale, in un considerevole numero di scrofe e scrofette, in un allevamento sito 1 in provincia di Brescia, comprendente circa 700 riproduttori. L'azienda, di recente costruzione e caratterizzata da un'ottima gestione, è organizzata in bande settimanali; vengono fecondate circa 36 scrofe settimana, per ottenere 31-33 parti settimana. La rimonta è interna, assicurata da un nucleo di scrofe Gran Parentali. L'allevamento è indenne da Malattia di Aujeszky e Trichinella, e positivo per PRRS, con sporadici segni clinici della malattia. Il seme viene acquistato da un centro verri esterno.

La gestione della sala parto prevede l'induzione del parto al 114 giorno di gravidanza, tramite

l'uso di Prostaglandine; le scrofette di primo parto non vengono mai indotte. Di prassi, gran parte delle scrofe oltre il 2° parto, vengono esplorate durante il parto per favorire l'espulsione e la vitalità dei suinetti stessi. Tale operazione non viene quasi mai eseguita su scrofe di 1° e 2° parto.

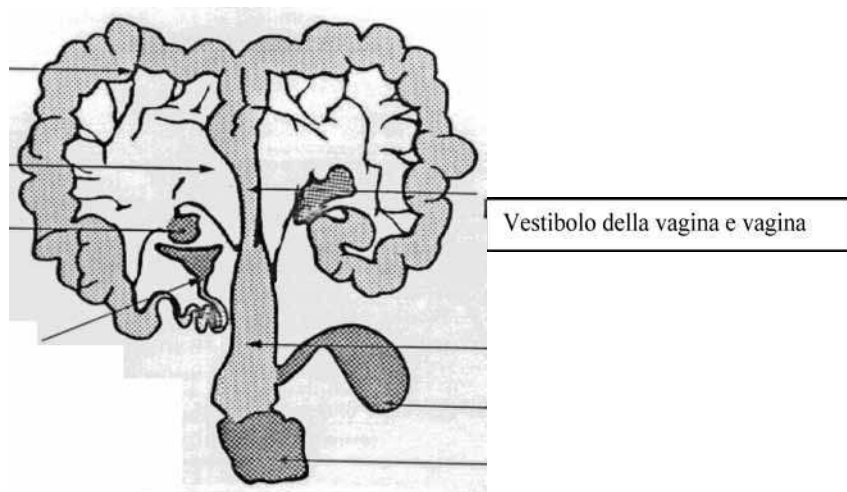
Dalla fine di agosto del 2013, su 2 scrofe in sala parto, è stata osservata una totale chiusura del canale del parto a livello vaginale; le scrofe non hanno partorito e sono entrambe morte durante il parto. Una limitata esplorazione, ha permesso di valutare una totale chiusura del canale del parto, caratterizzata dalla presenza di aderenze molto pronunciate fra le pareti della vagina, già a livello vestibolare. Di prassi, non venivano effettuati in allevamento trattamenti antibiotici di routine alle scrofe al parto, ed anche i trattamenti di massa, erano eseguiti solo se necessari.

MATERIALI E METODI

La descrizione clinica del caso, inizia verso fine marzo, inizio aprile, con alcuni problemi di PRRS, soprattutto sui suinetti pochi giorni dopo lo spostamento nel sito 2. Sulle scrofe e sui suinetti in sala parto, non sono stati osservati problemi di alcun tipo. In gestazione nello stesso periodo, si è avuto un considerevole aumento di ritorni in ruota, attribuiti ad un seme di qualità non ottimale ed acquistato da un diverso centro verri rispetto al fornitore abituale. Il nuovo fornitore di seme, non negativo alla PRRS, garantiva il seme consegnato tramite PCR per PRRS sul prelievo effettuato.

Fra maggio e giugno 2013, c'è stato un importante problema di fertilità, caratterizzato da riassorbimenti embrionali a 35-45 giorni di gestazione, su scrofe e scrofette già date gravide alla 1° ecografia. Nello stesso periodo si è ritornati al precedente fornitore di seme, proveniente da verri negativi alla PRRS.

Nell'ultima settimana di agosto 2013, 2 scrofe, entrambe di 8 parti, muoiono in sala parto a causa di una totale chiusura della vagina, nel tratto anatomico che collega cranialmente l'utero e caudalmente il vestibolo della vagina stessa. Le tenaci e diffusissime aderenze percepibili ad una esplorazione superficiale, hanno evidenziato la totale assenza della dilatazione del canale del parto e la conseguente morte degli animali colpiti. In questa fase è stata immediatamente sospesa la sincronizzazione dei parti tramite prostaglandine.



Nella settimana successiva lo stesso problema si è osservato in altre 2 scrofe, entrambe al 2° parto, mentre nelle settimane successive il problema è aumentato fino ad arrivare nei mesi di Ottobre e Novembre con circa 10-12 animali colpiti per settimana, pari a circa un terzo dei parti settimanali.

Tab. 1 Evoluzione cronologica del caso clinico

Tab.1 Chronological steps of the clinical case

PERIODO	N°SCROFE COLPITE
SETTIMANA 35	2
SETTIMANA 36	2
SETTIMANA 37	5
SETTIMANA 38	5
SETTIMANA 39	3
SETTIMANA 40	1
SETTIMANA 41	3
DA META' OTTOBRE A FINE NOVEMBRE 2013	59
TOTALE SCROFE COLPITE	80
SETTIMANA 50	SCOMPARSA DEL PROBLEMA

Tab. 2 Scrofe colpite in base al numero di parti

Tab. 2 Sows affected based on the number of parity

TOTALE SCROFE COLPITE	DI 1° PARTO	DI 2° PARTO	DA 2 A 10 PARTI
80	6	25	59

Una analisi anamnestica del problema ha messo in evidenza come, dalla seconda metà di aprile 2013 a ottobre 2013, sia stato utilizzato per esplorare gli animali al parto, un olio di paraffina, non adatto a questo scopo. E' plausibile pensare che questo prodotto possa aver contribuito ad aumentare un problema infettivo già presente in azienda. Altre pratiche ginecologiche non corrette, non sono state messe in evidenza.

Dalla seconda settimana di dicembre in poi, non ci sono stati più problemi al parto. Come in precedenza ricordato, non venivano effettuati trattamenti antibiotici di routine alle scrofe al parto ed eventuali medicazioni di massa erano fatte solo se necessarie.

Nella seconda settimana di settembre, sono state inviate al macello, alcune scrofe con evidenti problemi al parto, e dalle stesse è stato prelevato l'apparato riproduttore. La stessa cosa è stata fatta a fine settembre. Su tutti i campioni portati in laboratorio, sono state eseguite analisi anatomiche patologiche, batteriologiche ed istologiche.

Dal punto di vista anatomo-patologico è stata osservata una ipercheratosi dell'endometrio vaginale con colorazione brunastra della stessa e presenza di diffuse lacinie fibrose. L'esame istologico ha invece rilevato una utero- endometrite necrotico purulenta cronica con vistosi aggregati batterici, vasi trombizzati, calcificazioni distrofiche multifocali localizzate nella parete dei vasi, nel connettivo della sottomucosa. L'esame batteriologico ha evidenziato la presenza di flora batterica polimorfa su un campione e presenza di Streptococcus spp, su altri campioni.

Poiché in bibliografia è descritta una vestibulite infettiva nella donna sostenuta da Clamydia, è stata fatta una PCR per la ricerca della Clamydia stessa, risultata negativa.



Successivamente sono stati eseguiti 17 tamponi vaginali in scrofe in vari stadi della gestazione ed in sala parto, che hanno evidenziato presenza di Escherichia coli su 9 campioni, di Streptococco Spp. su 1 campione e di Pasteurella su un altro campione.

Dalla metà di settembre, si è deciso di intervenire con terapie antibiotiche così programmate:

Doxiciclina 3 gr di p.a./scrofa/giorno per 7 giorni, e dopo la fine del trattamento:

Amoxicillina 4,8gr di p.a./scrofa/giorno per 7 giorni, dopo 1 mese da questo trattamento:

Flumechina 3,2 gr di p.a./scrofa giorno per 7 giorni

Contemporaneamente si è deciso di somministrare Amoxicillina 4,8 gr di p.a./scrofa giorno per 6 giorni a cavallo del parto e la stessa molecola alla stessa posologia per una settimana prima dello svezzamento.

Sono state poi implementate le procedure di pulizia ed igiene nelle gabbie gestazione che ospitavano le scrofe prima della fecondazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La gravità e la percentuale di scrofe colpite nell'episodio descritto, ha in un primo tempo focalizzato la nostra attenzione su pratiche errate e/o eccessivamente traumatiche nelle scrofe al parto o al momento della fecondazione. In realtà l'unico significativo cambiamento, anche se non totalmente coincidente in termini temporali, è stato l'utilizzo di un gel per esplorazione non adatto per questo scopo. Il fatto poi che siano stati colpiti anche animali mai esplorati al parto, ci ha fatto ritenere la causa infettiva come la più probabile, forse accentuata dall'utilizzo di un prodotto non specifico per esplorazioni uterine.

In bibliografia non sono descritti casi di vaginiti infettive nelle scrofe come da quadro descritto.

E' inoltre plausibile pensare che l'infezione abbia interessato animali in vari stadi di gestazione, anche perché non esiste una correlazione fra inizio della terapia e scomparsa della sintomatologia al parto. Ciò significa che probabilmente i soggetti che hanno ricevuto un trattamento nella fase iniziale della infezione, hanno reagito bene al trattamento con la totale riduzione del processo infiammatorio e la non formazione di aderenze fibrose, al contrario gli animali che avevano già aderenze consolidate non hanno comunque portato a termine il parto.

IMPIEGO DELLA VACCINAZIONE NELLE SCROFE PER IL CONTROLLO DELLA MALATTIA DI GLÄSSER

THE GLÄSSER DISEASE CONTROL USING THE VACCINATION IN SOWS

BIASI G.¹, CAVALLARI M.², BONILAURI P.¹, ROSAMILIA A.¹, MAIOLI G.¹, GHERPELLI Y.¹, DOTTORI M.¹, LUPPI A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

²Dottore Agronomo

Parole chiave: *Haemophilus parasuis*, suino, sierotipizzazione, vaccinazione

Key words: *Haemophilus parasuis*, pig, serotyping, vaccination

Riassunto

Un focolaio di polisierosite ha colpito, nei mesi di gennaio e febbraio 2012, un allevamento multisito di 1400 scrofe, situato in nord Italia. Il 50% dei suinetti di 28 giorni d'età ha manifestato febbre alta (41,5 °C), tosse, respiro addominale, gonfiore articolare con zoppia e sintomi nervosi (decubito laterale, pedalamento e tremori) con un tasso di mortalità del 20% circa. Cinque suinetti sottoposti a necropsia e ad esame anatomopatologico hanno evidenziato quadri riferibili a malattia di Glässer (polisierosite, artrite fibrinosa, meningite). Da campioni patologici raccolti durante l'esame anatomopatologico è stato isolato un ceppo di *Haemophilus parasuis* successivamente sierotipizzato, tramite AGID, come sierotipo 13. Il ceppo isolato è stato utilizzato per la produzione di un vaccino stabulogeno. Le scrofe sono state vaccinate due volte ad intervallo di 28 giorni e le scrofette a 115 e 140 giorni di vita. Tutte le scrofe e le scrofette sono state rivaccinate a 77 giorni di gestazione. Dall'introduzione della vaccinazione non sono stati riportati casi di polisierosite in allevamento.

Abstract

During January and February 2012 an outbreak of polyserositis occurred in a 1400 sows multisite herd of northern Italy. A large number of piglets (50%) 28 days old showed high fever (41,5°C), coughing, abdominal breathing, swollen joints with lameness and central nervous signs (lateral decubitus, paddling and trembling) and the piglets mortality was approximately 20%. Necropsies performed on 5 piglets showed lesions compatible with a diagnosis of Glässer disease (polyserositis, fibrinous arthritis and meningitis). A strain of *Haemophilus parasuis* identified as serotype 13 was isolated from samples collected during the necropsies. The strain isolated was used to produce an autovaccine and sows were firstly vaccinated twice with an interval of 28 days and gilts were vaccinated at 115 and 140 day of life. All sows and gilts were then revaccinated at 77 days of gestation. After the introduction of the vaccination no cases of Glässer disease were recorded in the herd.

INTRODUZIONE

Haemophilus parasuis è l'agente eziologico della malattia di Glässer, patologia caratterizzata da polisierositi e poliartriti sierofibrinose o fibrinopurulente. Batterio cosmopolita, si presenta come coccobacillo Gram -, anaerobio facoltativo, immobile, non emolitico e dotato di spiccato polimorfismo. Negli ultimi anni le tecniche di allevamento intensivo adottate, con conseguente aumento degli "stressors" e il concomitante sviluppo di patogeni "door opener"

come il PRRSV hanno fatto sì che *H. parasuis* si ripresentasse come problema attuale ed in grado di provocare gravi danni anche in allevamenti suini con elevati standard sanitari. A tutt'oggi sono conosciuti 15 sierotipi di *H. parasuis* che presentano prevalenze diverse a seconda delle aree geografiche considerate. Tuttavia, analizzando studi di sierotipizzazione dei ceppi isolati, eseguiti in diversi Paesi Europei, si può osservare come i sierotipi 4, 5 e 13 risultino essere quelli prevalenti, mentre altri sierotipi come l'1, il 2, il 12, il 14 e il 15 mostrino prevalenze relativamente basse o addirittura trascurabili (Angen et al. 2004). I 15 sierotipi di *H. parasuis* sono stati classificati in 4 gruppi sulla base del grado di virulenza in suini SPF (Kielstein P. and Rapp-Gabrielson V.J., 1992). Nel primo gruppo sono stati classificati i sierotipi 1, 5, 10, 12, 13 e 14 che provocano forme cliniche acute caratterizzate da alta mortalità e morte in 96 ore. Nel secondo gruppo ritroviamo i sierotipi 2, 4 e 15 che provocano, invece, la cosiddetta forma sistemica, caratterizzata da polisierosite, con una mortalità bassa o assente. Nel terzo gruppo è presente il solo sierotipo 8 che si limita a provocare lievi sintomi e lesioni. Infine, al quarto gruppo, appartengono i sierotipi 3, 6, 7, 9 e 11 considerati commensali delle prime vie respiratorie, che non provocano quindi né sintomatologia clinica né lesioni. In condizioni di campo, tuttavia, i quadri clinici ed anatomopatologici provocati da un determinato sierotipo possono subire importanti variazioni. Questo si verifica perché *H. parasuis* può sovrapporsi ad infezioni virali come germe d'irruzione secondaria ovvero essere concomitante ad altre infezioni batteriche o ancora essere presente in un focolaio di malattia con più sierotipi. La colonizzazione da parte di *H. parasuis* inizia quando i suinetti sono ancora protetti dall'immunità passiva materna, la quale influenza in modo diretto la sensibilità delle nidiate a sviluppare la malattia. Quando l'equilibrio tra batterio ed immunità viene ad essere alterato da errate pratiche gestionali e da altri fattori come ad esempio lo stato immunitario dei suinetti, la presenza contemporanea di altri patogeni come PRRSV o PCV2, la virulenza dei ceppi di *H. parasuis* presenti o l'introduzione di nuovi sierotipi, si ha lo sviluppo della malattia (Aragon et al., 2012). L'immunità protettiva è legata allo sviluppo di anticorpi dopo infezione o vaccinazione e in quest'ultimo caso la completa protezione è ottenuta con l'impiego di vaccino omologo. La diversità antigenica tra i diversi sierotipi è un limite alla possibilità di avere vaccini realmente efficaci in termini di cross-protezione. Da quanto sopra esposto si sottolinea l'importanza della sierotipizzazione dei ceppi di *H. parasuis* sia per studi di prevalenza, sia per la scelta di appropriate misure di controllo della malattia. In questo contesto, soprattutto quando quest'ultimo obiettivo vuole essere raggiunto con l'impiego della vaccinazione, è necessario poter confrontare l'omologia tra i ceppi presenti nelle preparazioni vaccinali e quelli circolanti in allevamento. Quest'ultimo concetto è particolarmente importante nel valutare i possibili benefici ottenuti con la vaccinazione nei confronti di *H. parasuis*. Nel presente lavoro è descritto un caso clinico caratterizzato da ripetuti focolai di malattia di Glässer in un allevamento suino del nord Italia, focalizzando la trattazione principalmente sulle misure approntate per la risoluzione del problema sanitario.

MATERIALI E METODI

Il focolaio di malattia di Glässer, di seguito descritto, ha coinvolto un allevamento multisito, costituito da 1400 scrofe, con svezzamento dei suinetti a 21 giorni. L'allevamento era positivo a PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e PCV2. Il piano vaccinale nei suinetti prevedeva un solo intervento per Mhyo e PCV2 a tre settimane e successivamente per *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) e malattia di Aujeszky (PRV) a 70 e 100 giorni di vita. Una terza vaccinazione per PRV veniva fatta a 190 giorni. Le scrofe erano vaccinate per rinite atrofica a 70 e 90 giorni di gestazione, per parvovirus ed *Erysipelothrix rhusiopathiae* ogni 4 mesi e tre volte per PRV a 70, 100 e 160 giorni. L'allevamento eseguiva rimonta interna ed impiegava, per l'inseminazione delle scrofe, seme prodotto in allevamento. Le strutture dedicate alla gestazione presentavano ventilazione naturale, mentre nel sito 2 la ventilazione era forzata. Nelle sale

parto veniva effettuato il tutto pieno-tutto vuoto, dove veniva praticata una regolare pulizia e disinfezione tra i lotti. Tra gennaio e febbraio 2012, in un'elevata percentuale di suinetti (50%) di 28 giorni d'età, presenti in differenti box, si osservava febbre alta (41,5 °C), tosse, respiro addominale, gonfiore articolare, zoppia e sintomi nervosi (decubito laterale, pedalamento e tremori). Il 70% dei suinetti, presentante i segni clinici sopra descritti, proveniva da nidiate di scrofe primipare. La mortalità osservata nei suinetti nel corso del focolaio, si aggirava intorno al 20% e i sintomi descritti comparivano in concomitanza a viremie da virus della PRRS. Cinque suinetti clinici, sono stati sacrificati per garantire l'elevata qualità del materiale patologico da sottoporre ad esame batteriologico presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Sulla base dei rilievi anatomopatologici, eseguiti sui suinetti sopraccitati, sono state condotte le indagini di laboratorio ritenute più opportune, seguendo i protocolli standardizzati presso il laboratorio di diagnostica generale della Sezione di Reggio nell'Emilia. In particolare, in presenza di quadri macroscopici compatibili con una diagnosi di malattia di Glässer, è stato applicato il protocollo diagnostico di seguito descritto. Il materiale patologico costituito da polmoni, tamponi bronchiali, tamponi da liquido pericardico e da liquido cefalorachidiano e prelievi di liquido sinoviale, sono stati utilizzati per la semina su 3 differenti terreni: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con nicotinnamide adenina dinucleotide-NAD. Quest'ultimo è stato utilizzato per permettere la crescita di quei patogeni che, come l'*H. parasuis* sono NAD dipendenti. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore, in aerobiosi per le piastre di agar siero e di agar Gassner ed in termostato a CO₂ per l'agar sangue addizionato con NAD. Al termine dell'incubazione la crescita di *H. parasuis* è stata confermata tramite test morfologici (crescita di colonie con morfologia tipica su agar sangue addizionato con NAD e al microscopia ottico dopo colorazione di Gram) e biochimici (colonie non emolitiche NAD dipendenti, catalasi positive, ureasi negative e indolo positive).

RISULTATI

I quadri macroscopici osservati durante le necrosopie erano caratterizzati da polisierosite fibrinosa (peritonite, pleurite e pericardite fibrinose), broncopolmonite catarrale ai lobi apicali, presenza di petecchie emorragiche in diversi organi (rene, fegato e polmone) e quadri di linfadenomegalia generalizzata. Dal materiale patologico prelevato durante l'attività necroscopica sono state eseguite indagini batteriologiche, come riportato precedentemente. Dopo 24 e 48 ore di incubazione, le piastre sono state esaminate per valutare l'eventuale crescita batterica. Dopo 48 ore di incubazione piccole colonie di colore grigio-bruno, traslucide, non emolitiche sono comparse su agar sangue addizionato con NAD da polmone (3/5), dagli essudati bronchiali (3/5), da tampone pericardico (2/5), da tampone cerebrale (2/5) e da essudato articolare (2/5). Le colonie batteriche isolate Gram -, pleomorfe, NAD dipendenti, catalasi positive, ureasi negative e indolo positive sono state identificate come *H. parasuis*. La suscettibilità antibiotica degli isolati è stata determinata mediante una metodica di microdiluizione con kit commerciale a 96 pozzetti. Gli antimicrobici testati e il loro range di diluizione sono rispettivamente: penicillina (PEN) 0.12-8 mg/ml; ampicillina (AMP), 0.25-8 mg/ml; ceftiofur (XNL), 0.25-8 mg/ml; gentamicina (GEN), 1-16 mg/ml; neomicina (NEO), 4-32 mg/ml; spectinomicina (SPE), 8-64 mg/ml; ossitettraciclina (OXY), 0.5-8 mg/ml; tilmicosina (TIL), 4-32 mg/ml; enrofloxacin (ENRO), 0.12-2 mg/ml; florfenicolo (FFC), 0.25-8 mg/ml; tiamulina (TIA), 1-32 mg/ml e trimetoprim/sulfametossazolo (COT), 0.5/9.5-2/38 mg/ml. L'interpretazione dei risultati ha previsto l'utilizzo dei breakpoints indicati da Aaerstrup et al. (2004) (PEN, AMP, XNL, SPE, TIL, FFC, TIA E COT), dal CLSI (2004) per *A. pleuropneumoniae* o *Histophilus somni* (OXY, GEN e ENRO) e da CASFM (2011) (NEO). I risultati della sensibilità antimicrobica sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Suscettibilità antimicrobica del ceppo di *H. parasuis* isolato. I risultati sono stati ottenuti usando un metodo di microdiluzione.

Table 1. Antimicrobial susceptibility of the strain of *H. parasuis* isolated. The test was performed using a microdilution method.

Antimicrobico		MIC breakpoints (µg/ml)		Risultati
		S	R	
PEN	Penicillina	≤ 2	≥ 4	R
AMP	Ampicillina	≤ 2	≥ 4	R
XNL	Ceftiofur	≤ 2	≥ 4	S
SPE	Spectinomina	≤ 32	≥ 128	R
TIL	Tilmicosina	≤ 8	≥ 32	S
FFC	Florfenicolo	≤ 2	≥ 8	S
TIA	Tiamulina	≤ 16	≥ 32	S
COT	Trimetoprim/sulfametossazolo	≤ 2	≥ 4	S
GEN	Gentamicina	≤ 4	≥ 16	R
NEO	Neomicina	≤ 8	≥ 16	R
ENRO	Enrofloxacin	≤ 0.25	≥ 2	S

I ceppi di *H. parasuis* isolati sono stati tipizzati tramite AGID e sono risultati appartenere al sierotipo 13. I suinetti sono stati trattati utilizzando trimetoprim/sulfametossazolo e florfenicolo con lo scopo di controllare la problematica sanitaria, ottenendo una riduzione della mortalità. Tuttavia, numerosi focolai di polisierosite presentanti caratteri sovrapponibili, con quanto descritto precedentemente, sono stati registrati nel corso della primavera successiva. Valutazioni di tipo epidemiologico, clinico ed economico hanno portato a considerare l'introduzione della vaccinazione nei confronti di *H. parasuis* impiegando un vaccino stabulogeno allestito presso l'IZSLER con il ceppo isolato in allevamento, essendo il sierotipo 13 non incluso nei vaccini in commercio. Il protocollo vaccinale ha previsto che gli interventi vaccinali nelle scrofe venissero effettuati con un intervallo di 28 giorni tra un intervento e quello successivo mentre le scrofette sono state vaccinate a 115 e 140 giorni di vita. Tutte le scrofe e le scrofette sono state quindi sottoposte a richiamo prima del parto a 77 giorni di gestazione. La mortalità dei suinetti nel post svezzamento dopo l'introduzione della vaccinazione si è mantenuta intorno al 2 % e nessun focolaio di polisierosite è stato riportato nell'allevamento fino ad oggi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il caso clinico riportato descrive un focolaio causato da *H. parasuis*, l'iter diagnostico e la gestione della problematica sanitaria fino alla sua risoluzione. La gravità del caso clinico descritto ed il suo carattere ricorrente è probabilmente legato alla virulenza del ceppo di *H. parasuis*, che come descritto in precedenza, è risultato appartenere al sierotipo 13, il secondo sierotipo in Italia dopo il sierotipo 4, in termini di prevalenza (Luppi et al., 2012). Non è possibile escludere o confermare se il ceppo di *H. parasuis* isolato costituisca una nuova introduzione in allevamento perché non sono disponibili precedenti dati riguardanti altri focolai di polisierosite o l'isolamento di *H. parasuis*. Il ceppo isolato presentava resistenza a penicillina, ampicillina, streptomina, neomicina e gentamicina. La multiresistenza tra ceppi

di *H. parasuis* stata descritta in paesi come Spagna e Cina mentre un'elevata percentuale di sensibilità agli antimicrobici viene registrata in Danimarca e Inghilterra (Aarestrup et al., 2004; Martin de la Fuente et al., 2007; Zhou et al., 2010). Queste differenze in termini di sensibilità agli antibiotici sarebbero correlabili ad un maggior utilizzo di molecole antibatteriche dove i fenomeni di resistenza risultano in aumento. L'utilizzo della terapia antibiotica nel caso sopra riportato pur sortendo effetti positivi in termini di riduzione della sintomatologia clinica e della mortalità, non ha permesso il completo controllo dei focolai che si sono susseguiti nei suini svezzati intorno a 28 giorni d'età anche nei mesi successivi al primo focolaio. In seguito al protrarsi del problema è maturata la necessità di intraprendere due strade: lo spostamento dei suinetti di 6 kg in allevamenti sito 2 gestiti in tutto pieno – tutto vuoto e, contemporaneamente, l'introduzione della profilassi vaccinale e più nello specifico di utilizzare un vaccino stabulogeno prodotto con il ceppo isolato in allevamento. Nel caso descritto non è stato utilizzato il vaccino del commercio, contenente i sierotipi 4 e 5 e pertanto non possono essere espresse valutazioni sulla possibile protezione di questo nei confronti del ceppo eterologo (sierotipo 13) isolato in allevamento. Dati raccolti dalla letteratura indicano come il sierotipo 4 sia protettivo nei confronti di infezioni con il sierotipo sia omologo, sia eterologo (sierotipo 5). L'impiego di un vaccino bivalente contenente i sierotipi 4 e 5 sarebbe in grado di ridurre significativamente le lesioni causate da infezioni di ceppi di *H. parasuis* appartenenti ai sierotipi 13 e 14 fornendo quindi almeno una parziale protezione immunitaria (Aragon et al., 2012). Ritornando al caso descritto nel presente lavoro, il vaccino stabulogeno prodotto è stato quindi impiegato con una strategia basata sulla vaccinazione di scrofe e scrofette e conseguente trasmissione di una solida immunità materna ai suinetti nati da queste, oltretutto la gestione degli allevamenti sito 2 ha permesso di ridurre la carica batterica in scrofaia e ha evitato la trasmissione diretta tra suini di età differenti. Studi condotti sulla protezione dell'immunità passiva materna, nei confronti della malattia, hanno dimostrato come suinetti infettati da ceppi virulenti in presenza di una solida immunità materna siano protetti dalla comparsa della forma clinica, con benefici osservabili anche nel post svezzamento. Partendo da questi presupposti la vaccinazione di scrofe e scrofette può essere utilizzata come strategia per la riduzione delle problematiche legate alla malattia di Glässer (Aragon et al., 2012).

BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Angen O., 2004. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary microbiology* 101:143-146.
- Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R., 2004. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 103: 255-258.
- Aragon V., Segales J., Oliveira S., 2012. Glässer's Disease. In: Zimman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. *Disease of Swine*, Blackwell Publishing, Ames (Iowa, USA) pp. 760-769.
- De la Fuente A.J.M., Tucker A.W., Navas J., Blanco M., Morris S.J., Gutierrez –Martin C.B., 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology* 120: 1834.-191.
- Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Iodice G., Gherpelli Y., Merialdi G., Maioli G., Martelli P., 2013. *Haemophilus parasuis* serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transboundary and Emerging Diseases* 60: 140-142.
- Zhou X., Xu X., Zhao Y., Chen P., Zhang X., Vhen. H., Cai X., 2010. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 141: 168-73.

**STUDIO TRASVERSALE SULL'ELIMINAZIONE FECALE DI
B. HYODYSENTERIAE IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE
ENDEMICAMENTE INFETTO**

***B. HYODYSENTERIAE* SHEDDING BY SOWS FROM AN
ENDEMICALLY INFECTED HERD: A TRANSVERSAL STUDY**

CUCCO L.¹, CHIANCONE F.M.¹, DETTORI A.¹, BORIOSI G.², SEBASTIANI C.¹,
PEZZOTTI G.¹, MAGISTRALI C.F.¹

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia;

2 Veterinario, Martini S.p.A.

Parole chiave: *B. hyodysenteriae*, scrofa, PCR real time, eliminazione fecale

Key words: *B. hyodysenteriae*, sow, real time PCR, faecal shedding

Riassunto: la dissenteria suina è una malattia ri-emergente causata da *B. hyodysenteriae*. I riproduttori costituiscono una fonte di infezione per i suinetti e una delle più importanti modalità di persistenza di *B. hyodysenteriae* negli allevamenti a ciclo chiuso; tuttavia le informazioni disponibili in letteratura sulla escrezione di questo patogeno nelle scrofe sono scarse.

Scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere le modalità di escrezione fecale di *B. hyodysenteriae* in un allevamento di 1800 scrofe infetto in modo endemico, valutando in parallelo il test in real time, il colturale tradizionale e la quantità di sostanza secca fecale e distinguendo gli animali in pluripare e primipare. All'esame colturale, il dato di prevalenza di *Brachyspira* spp. nelle primipare è risultato pari al 9% (I.C. 95% 4,46-16,83), mentre nelle pluripare si è collocato al 3,23% (I.C. 95% 1,04-8,55), tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa. Solo un isolato è risultato appartenere alla specie *B. hyodysenteriae*; questo proveniva da una primipara sintomatica. La prevalenza rilevata dal colturale è stata pari allo 0,45% (I.C. 95% 0,02-2,85). Sette scrofe, di cui 3 primipare, sono risultate positive in PCR real time per *B. hyodysenteriae*, con una prevalenza del 3,13% (I.C. 95% 1,38-6,60). La quantità di patogeno escreto variava da $6,73 \cdot 10^3$ /g di feci, dato rilevato in una pluripara, a $1,78 \cdot 10^8$ /g di feci, in una scrofa primipara. Il 90% circa dei campioni prelevati ricadeva in una categoria di sostanza secca nelle feci 1, corrispondente alla normalità. Tre delle pluripare infette rilevate in PCR real time presentavano una categoria di sostanza secca pari a 1, confermando la presenza di eliminatori asintomatici. In conclusione, la prevalenza di escrezione di *B. hyodysenteriae* nell'allevamento considerato è apparsa molto contenuta, così come la presenza di animali con diarrea. La real time PCR ha consentito di individuare un numero di soggetti escretori più elevato e di eliminatori asintomatici di *B. hyodysenteriae*, questo test appare quindi più adatto rispetto al colturale ad essere applicato in studi epidemiologici.

Abstract: swine dysentery is a reemerging disease caused by *B. hyodysenteriae*. Breeders are a source of infection for piglets and they can maintain and spread *B. hyodysenteriae* in farrow to finish herds. However, the information available in literature on *B. hyodysenteriae* shedding by sows is scarce. The aim of this work was to describe *B. hyodysenteriae* shedding in faeces in an endemically infected herd, hosting 1800 animals. The samples were tested for *B. hyodysenteriae* in parallel by real time PCR, and culture, dry matter content; sampling was calculated to estimate prevalence in both primiparous and pluriparous sows. The prevalence

of *Brachyspira* spp. infection by culture was estimated as 9% (I.C. 95% 4,46-16,83) in primiparous sows and 3,23% (I.C. 95% 1,04-8,55) in pluriparous sows: this difference was not statistically significant. Only one sample, from a symptomatic primiparous sow, was positive for *B. hyodysenteriae* by culture. Seven animals, of which three primiparous sows, tested positive for *B. hyodysenteriae* by real time PCR; the *B. hyodysenteriae* prevalence estimated by culture was 0,45% (I.C. 95% 0,02-2,85) and 3,13% (I.C. 95% 1,38-6,60) by real time PCR. The amount of bacteria excreted by faeces varied from $6,73 \cdot 10^3/g$, in a pluriparous sow, to $1,78 \cdot 10^8 /g$, in a primiparous sow. Approx. 90% of the samples fell within Category 1 for dry matter content, therefore they were categorized as normal faeces. *B. hyodysenteriae* was detected by real time PCR in three samples belonging to dry matter content Category 1; these three samples were from pluriparous sows, thus confirming the presence of asymptomatic shedders. In conclusion, the prevalence of *B. hyodysenteriae* shedding in the herd was low, as was the presence of diarrheic animals. Real time PCR detected a higher number of shedders and asymptomatic *B. hyodysenteriae* excreting sows. This test is therefore more suitable than culture for application in epidemiologic studies.

INTRODUZIONE

Il batterio anaerobio *Brachyspira hyodysenteriae* è l'agente eziologico della dissenteria emorragica suina, patologia che provoca importanti perdite economiche negli allevamenti. La morbilità e la mortalità negli animali in accrescimento possono raggiungere rispettivamente il 90% e il 30% (Hampson et al. 2006). Il contagio tra individui avviene con facilità mediante le feci infette; la malattia si manifesta di norma dopo 10-14 giorni dal contatto. Nella fase acuta i suini eliminano fino a 10^7 - 10^{10} cellule batteriche per ogni grammo di feci; il patogeno può essere individuato nel materiale fecale per un periodo anche di 70 giorni dopo la scomparsa dei sintomi (Rasback et al. 2005).

L'individuazione dell'infezione nei suini riproduttori è particolarmente problematica, anche perché in corso di forme subacute o croniche, la sintomatologia si può facilmente confondere con quella derivante da altre patologie (Merialdi 2013). La diagnosi di dissenteria suina si basa tradizionalmente su esame colturale e conferma mediante PCR: un iter che ha tempi di esecuzione piuttosto lunghi, di circa una settimana. L'esame batteriologico, inoltre, presenta una sensibilità contenuta, dovuta anche al fatto che il rilevamento di *B. hyodysenteriae* può essere mascherato dalla presenza di altri microrganismi (Rasback et al. 2005). Questo giustifica la scarsità in letteratura di dati sull'escrezione batterica da parte delle scrofe, dati che tuttavia sono necessari per comprendere le modalità di trasmissione del patogeno ed impostare corretti piani di controllo della dissenteria suina negli allevamenti (Patterson et al. 2013). Negli ultimi anni si è proposto il ricorso a tecniche di PCR real-time, che presentano il vantaggio di poter quantificare il DNA batterico del campione fornendo una stima del livello di contaminazione presente (Akase et al. 2009).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare sulla presenza di *B. hyodysenteriae* all'interno di un allevamento di suini riproduttori in cui erano stati evidenziati casi di dissenteria suina, per evidenziare le modalità di escrezione del patogeno attraverso le feci. La ricerca del patogeno è stata effettuata in parallelo mediante esame colturale e in real-time PCR, per individuare la tecnica più idonea in questo tipo di indagini.

MATERIALI E METODI

Campionamento

I campioni sono stati prelevati da un allevamento di riproduttori localizzato in Italia

centrale in cui erano stati riscontrati casi di dissenteria suina, seguita da isolamento di *B. hyodysenteriae*, nel corso del semestre precedente. Nell'azienda erano presenti 1700 scrofe, suddivise in 320 primipare e 1380 pluripare. L'allevamento era composto da 5 strutture distinte, due delle quali ospitavano sale parto, mentre in altre due erano presenti i box gestazione, in un caso con le gabbie di fecondazione. L'ultimo capannone invece era destinato alle rimonte, distinte in diverse fasce di età: dai 28 ai 100 giorni gli animali erano collocati prima in gabbia e successivamente a terra; infine dai 101 ai 180 giorni, erano trasferite in un'altra stanza e poste in box. In quest'ultimo capannone erano inoltre ospitate alcune sale parto. La pavimentazione era in grigliato di cemento, con fosse comunicanti nello stesso capannone.

Considerando che la prevalenza attesa è pari al 7% per la prima categoria e al 9% per la seconda (Patterson, 2013), si è ipotizzato un campionamento con un errore standard del 5% ed un intervallo di confidenza del 95%. In complesso sono state analizzate feci di 100 scrofe primipare e 124 pluripare.

Le feci sono state prelevate individualmente dalla ampolla rettale, mantenute a temperatura di refrigerazione e l'esame colturale allestito nell'arco di 24 ore dal momento del prelievo. I campioni sono stati esaminati utilizzando in parallelo esame colturale selettivo e real time PCR per *B. hyodysenteriae* e infine ne è stata determinata la sostanza secca. In allevamento sono stati anche prelevati 29 campioni di sangue dalle primipare e 21 dalle pluripare.

Determinazione della sostanza secca

La percentuale di sostanza secca è stata misurata applicando il protocollo descritto da Pedersen et al. (2011). In breve, circa 5 g di feci sono stati pesati e introdotti in un contenitore di plastica sterile, di cui è stato annotato il peso totale. Il campione è stato riscaldato in forno a microonde a 120 W per 30 minuti e poi a 385 W per 10 minuti. A questo punto il contenitore con le feci è stato riscaldato di nuovo a 385 W e pesato ogni 5 minuti finché non si è osservato che il peso rimaneva costante. La percentuale di sostanza secca è stata quindi calcolata con la formula seguente: $SS\% = (\text{peso finale dell'essiccato col barattolo} - \text{peso del barattolo}) / \text{peso iniziale fresco} \times 100$.

Esame colturale per la ricerca di *B. hyodysenteriae*

L'esame colturale è stato condotto come già descritto (Sebastiani et al. 2013). In breve, il materiale fecale è stato seminato in TSA-BJ medium e posto ad incubare a $41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per almeno 5 giorni. Al termine del periodo di incubazione, eventuali colonie sospette per *Brachyspira* spp. sono state esaminate mediante microscopia ottica e successivamente isolate e confermate tramite PCR end-point secondo il protocollo descritto da La, et al. (2006), specifico per le due sole specie *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*.

RFLP

L'identificazione dei ceppi di *Brachyspira* non riconducibili a *B. hyodysenteriae* è stata effettuata con il metodo basato su polimorfismo dei frammenti di restrizione descritto in Rhode et al. 2012. Questo protocollo permette di discriminare tra loro le specie *B. murdochii*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*. In breve, il DNA, estratto da colonia per bollitura, è stato sottoposto a PCR usando primer specifici per l'amplificazione del gene *nox* (Bnox f 5'-TAG C(CT)T GCG GTA T(CT)G C(AT)C TTT GG-3' e Bnox r 5'-CTT CAG ACC A(CT)C CAG TAG AAG CC-3'). Gli amplificati sono stati digeriti con gli enzimi DpnII e SfcI per 15 minuti a 37°C. I frammenti sono stati separati in gel di agarosio al 2%, ottenendo profili caratteristici per ogni specie batterica.

Real-time PCR

PCR Real-time multiplex: i DNA estratti dalle feci sono stati analizzati tramite PCR real-time multiplex come descritto da Willems H. et al (2010). I primers e le sonde utilizzate sono dirette all'amplificazione del gene *nox* per *Brachyspira* e del gene *aspA* per *L.intracellularis*. La reazione, condotta in un volume finale di 25µl, era costituita da 12,5µl di Quantitect Multiplex Mastermix (Qiagen), primers e sonde (0,18-0,3 µM) e 2,5µl di DNA target. Per l'analisi quantitativa, gli standard per le curve di taratura sono stati ottenuti, per ciascun patogeno, attraverso l'amplificazione delle regioni genomiche target della PCR real-time; gli amplificati sono stati poi purificati con il kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen), quantizzati spettrofotometricamente ed è stato successivamente calcolato il numero di copie di DNA corrispondente. Per ognuno dei tre patogeni in esame le curve di taratura erano costituite da diluizioni scalari in base 10 (da 1x10⁶ a 1x10² copie di DNA). Le reazioni sono state eseguite utilizzando la piattaforma 7900 HT SequenceDetection System (Life Technologies).

Elaborazione statistica:

Sono state calcolate le prevalenze ed i relativi intervalli di confidenza al 95% di *B. hyodysenteriae* ottenute con l'esame colturale e con la PCR real-time e le prevalenze di *Brachyspira* spp. nelle primipare e nelle pluripare. Con il test esatto di Fischer è stata calcolata la differenza tra i due gruppi di animali. E' stata valutata la concordanza tra PCR in real time e colturale per *B. hyodysenteriae* utilizzando il test K di Cohen.

RISULTATI

I dati relativi alla sostanza secca sono stati organizzati in quattro categorie sulla base dei valori di cut-off forniti da Pedersen et al. (2011). Cat. 1: percentuale di sostanza secca >19,5. Cat. 2: sostanza secca tra 18 e 19,5. Cat. 3: sostanza secca tra 11,3 e 18. Cat. 4: sostanza secca <11,3. I dati sono mostrati in Tab. 1.

Categorie	Primipare	Pluripare	Totale
1	84 (84,0%)	121 (97,6%)	205 (91,5%)
2	2 (2,0%)	2 (1,6%)	4 (1,8%)
3	8 (8,0%)	1 (0,8)	9 (4,0%)
4	0	0	0
Non eseguiti	6 (6,0%)	0	6 (2,7%)
Totale	100 (100%)	124 (100%)	224 (100%)

Un solo campione tra i 224 analizzati è risultato positivo all'esame colturale per la ricerca di *B. hyodysenteriae*. Si tratta di feci prelevate da una scrofa primipara del gruppo 28-100 giorni, stabulata in gabbia, che presentava diarrea emorragica. I campioni derivanti da primipare di età superiore ai 100 giorni hanno mostrato un'elevata contaminazione da specie fungine, che potrebbe aver impedito il rilievo di eventuali *B. hyodysenteriae* presenti. In 12 campioni l'esame batteriologico ha messo in evidenza la presenza di ceppi di *Brachyspira* non appartenenti alla specie *B. hyodysenteriae*. Questi ceppi sono stati isolati e poi identificati mediante RFLP (Tabella 2).

Specie	Numero isolati da primipare	Numero isolati da pluripare	Totale
<i>B. murdochii</i>	1	1	2
<i>B. innocens</i>	4	0	4
<i>B. intermedia</i>	2	2	4
<i>B. hyodysenteriae</i>	1	0	1
Non identificato	1	1	2
Totale	9	4	13

Il dato di prevalenza di *Brachyspira* spp. nelle primipare è risultato pari al 9% (I.C. 95% 4,46-16,83), mentre nelle pluripare si è collocato al 3,23% (I.C. 95% 1,04-8,55). La differenza tra i due gruppi, calcolata con il test esatto di Fischer, non è risultata statisticamente significativa ad un livello di significatività del 95%

La PCR real time ha invece evidenziato la presenza di 7 feci positive per *B. hyodysenteriae*, di cui tre primipare e quattro pluripare. Non si sono invece riscontrati campioni positivi per *B. pilosicoli* e *Lawsonia intracellularis*. Tra le feci positive per *B. hyodysenteriae*, è compreso il campione risultato positivo all'esame colturale. In Tabella 3 è indicata l'entità della contaminazione, espressa come numero di copie di DNA per grammo di feci.

Le prevalenze di *B. hyodysenteriae* ottenute con il metodo batteriologico e con quello molecolare risultano rispettivamente pari allo 0,45% (I.C. 95% 0,02-2,85) e al 3,13% (I.C. 95% 1,38-6,60). Il valore di concordanza (K di Cohen) tra PCR in real time e colturale per *B. hyodysenteriae* è di 0,244, che è considerato nella scala di Altman un lieve accordo.

Identificativo campione	n. copie di DNA/g di feci	Colturale
Primipara 82	9,13*10 ⁶	neg
Primipara 97	2,54*10 ⁷	pos
Primipara 98	1,78*10 ⁸	neg
Pluripara 12	2,16*10 ⁵	neg
Pluripara 13	1,87*10 ⁵	neg
Pluripara 42	6,73*10 ³	neg
Pluripara 46	9,05*10 ³	neg

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio dell'escrezione di *B. hyodysenteriae* nei riproduttori è stato ostacolato dall'assenza di un metodo diagnostico sufficientemente sensibile per l'identificazione dell'infezione in questa categoria di animali. L'esame colturale si è infatti rivelato inadatto per rilevare l'eliminazione di questo patogeno in soggetti asintomatici. Questo ha limitato la disponibilità di studi su prevalenza e trasmissione di *B. hyodysenteriae* nei riproduttori, in grado di fornire dati utili per impostare piani di contenimento della malattia. Inoltre, un metodo dotato di una sensibilità superiore rispetto al colturale potrebbe essere impiegato per l'identificazione degli allevamenti indenni, che potrebbero fungere da fonte di animali in corso di ripopolamento.

I dati raccolti nel corso di questo lavoro hanno confermato come il test colturale presenti una bassa sensibilità: infatti, un solo campione, proveniente da una primipara con sintomatologia riconducibile a dissenteria emorragica, è risultato positivo con questa metodica, che risente della presenza di contaminanti nel materiale fecale. Inoltre, altre specie appartenenti al genere *Brachyspira* possono mascherare la presenza di *B. hyodysenteriae*: nel corso di questa indagine ad esempio, una scrofa è risultata positiva solo in PCR real time, ma l'esame colturale ha permesso di isolare una *B. murdochii*. L'interferenza di altre specie del genere *Brachyspira* sulla sensibilità dell'esame batteriologico per *B. hyodysenteriae* è nota in letteratura: ad esempio, viene riportato come, in casi di infezioni miste, sia necessario che il numero di cellule di *B. hyodysenteriae* sia di 10 volte più elevato di quello di *B. pilosicoli* per consentire il rilievo della prima (Rasback, 2005). Nonostante l'allevamento fosse infetto in modo endemico e al momento del prelievo si fossero rilevati animali con sintomatologia riferibile a SD, la prevalenza stimata attraverso esame colturale è stata molto contenuta, inferiore all'1%. La sensibilità dell'esame batteriologico è molto variabile, Stege (2000) ad esempio, ha riportato come sia necessaria una concentrazione di 10^6 cellule/g di feci perché *B. hyodysenteriae* sia rilevata, : dato che è in accordo con quanto osservato nel corso del presente lavoro. Il test in PCR real time ha permesso di individuare un numero di scrofe eliminatrici più elevato, pari al 3% circa, consentendo inoltre di quantificare la presenza di *B. hyodysenteriae* nelle feci. D'altra parte l'esame batteriologico ha evidenziato la presenza di altre specie appartenenti al genere *Brachyspira*; dal momento che sono recentemente emerse nuove specie patogene questa caratteristica non appare trascurabile (Mahu et al., 2014). L'escrezione di *B. hyodysenteriae* avviene in modo intermittente e con bassi livelli, soprattutto nelle scrofe pluripare, come sembrano indicare i dati raccolti nella presente indagine. È importante rilevare come, nonostante la presenza di animali sintomatici, la categoria di sostanza secca delle feci ricadeva nella normalità in più del 90% dei casi, testimoniando un andamento strisciante della malattia. Inoltre, tre delle pluripare identificate mediante PCR real-time presentavano una percentuale di sostanza secca nelle feci all'interno degli intervalli di normalità, confermando la presenza di soggetti eliminatori asintomatici. Attualmente, tuttavia, il test in PCR real time non sembra offrire un incremento in sensibilità sufficiente per un suo impiego in piani di eradicazione, al fine di categorizzare gli allevamenti di riproduttori in infetti e non infetti, anche in considerazione del suo costo elevato. L'esame periodico da parte del veterinario in allevamento appare ancora un passaggio cruciale per la corretta identificazione della azienda, mentre i test di laboratorio risultano adeguati solo per sostenere la diagnosi eziologica formulata in sede clinica.

Lo studio dell'escrezione di *B. hyodysenteriae* attraverso metodi diretti appare invece utile per valutare le modalità di circolazione di questo patogeno negli allevamenti infetti: questi dati infatti, sono scarsi in letteratura, nonostante la dissenteria suina sia una malattia conosciuta da quasi un secolo. Nel corso di questo lavoro non abbiamo osservato differenze significative nell'escrezione di *Brachyspira* spp. o *B. hyodysenteriae* tra primipare e pluripare, anche se è possibile che le basse prevalenze riscontrate abbiano ostacolato il rilievo di questo dato in allevamento. Ci pare tuttavia importante sottolineare come nella azienda in esame, non si realizzasse una separazione completa tra i diversi gruppi di animali, in particolare nel capannone destinato alle rimonte, dove convivevano animali di età diversa ed erano presenti fosse comuni per il liquame. Questo può avere favorito la circolazione del patogeno in settori e categorie diverse di scrofe. Le infezioni enteriche, trasmettendosi per via oro-fecale tendono a circolare in cluster associati alla collocazione degli animali: come dimostrato per *Salmonella* (Pires et al. 2013); anche in questo lavoro i campioni positivi per *B. hyodysenteriae* tendevano a raggrupparsi in alcuni box o gruppi di animali, ad esempio le pluripare positive erano tutte collocate nelle gabbie di fecondazione.

In conclusione, in questo lavoro l'eliminazione fecale di *B. hyodysenteriae* nelle scrofe in un allevamento endemicamente infetto è risultata essere associata a livelli di prevalenza molto contenuti. Inoltre, la PCR real time ha permesso di identificare un numero di animali eliminatori più consistente, comprendendo anche soggetti asintomatici.

BIBLIOGRAFIA

Akase S., Uchitani Y., Sohmura Y., Tatsuta K., Sadamasu K., Adachi Y. (2009) "Application of real time PCR for diagnosis of Swine Dysentery." *J Vet Med Sci.* 71, 359-62.

Hampson D.J., Fellstrom C., Thomson J.R. (2006) "Swine dysentery." In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., editors. "Diseases of Swine." Blackwell Publishing Professional; Ames, IA, USA: 2006. pp. 785-805.

La T., Collins A.M., Phillips N.D., Oksa A., Hampson D.J. (2006) "Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces". *Lett appl microbiol* 42, 284-288.

Meriardi G. (2013) Coliti da *Brachyspira*. In: Martelli P. et al. *Le patologie del maiale*. 1° ed., Milano, Le Point Veterinarie Italie Srl. 441-452.

Mahu M, de Jong E, De Pauw N, Vande Maele L, Vandembroucke V, Vandersmissen T, Miry C, Pasmans F, Haesebrouck F, Martel A, Boyen F. First isolation of "Brachyspira hamptonii" from pigs in Europe. *Vet Rec.* 2014 Jan 11;174(2):47.

Patterson A.H., Rubin J.E., Fernando C., Costa M.O., Harding J.C., Hill J.E. (2013) "Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of "Brachyspira hamptonii"-associated colitis." *BMC Vet Res.* 11, 9-137. doi: 10.1186/1746-6148-9-137.

Pedersen K.S., Stege H., Nielsen J.P. (2011) "Evaluation of a microwave method for dry matter determination in faecal samples from weaned pigs with or without clinical diarrhoea." *Prev Vet Med.*100, 163-170. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.014. Epub2011 May 14.

Pires AF, Funk JA, Lim A, Bolin SR. Enumeration of salmonella in feces of naturally infected pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 2013 Nov;10(11):933-7

Råsbäck T., Fellström C., Gunnarsson A., Aspán A.(2006) "Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*." *J Microbiol Methods.* 66, 347-53.

Rohde J., Habighorst-Blome K. (2012) "An up-date on the differentiation of *Brachyspira* species from pigs with nox-PCR-based restriction fragment length polymorphism." *VetMicrobiol.* 158, 211-215.

Sebastiani C.; Cucco, L.; Ciullo M.; Maresca, C.; Scoccia, E.; Tartaglia M.; Magistrali C.F. (2013) Valutazione di un test di PCR real-time per la diagnosi delle enteriti batteriche del magronaggio ed ingrasso. *Atti della Società Italiana di Patologia ed allevamento del suino,* 2013: 203-211.

Stege H, Jensen TK, Møller K, Baekbo P, Jorsal SE. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med.*2000 Sep 1;46(4):279-92.

Willems H., Reiner G. (2010) "A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123, 205-209.

UTILIZZO DELLA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE (MLST) E DELLA SIEROLOGIA PER LO STUDIO DELL'EPIDEMIOLOGIA DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* IN UN ALLEVAMENTO SUINO MULTISITO

USE OF MOLECULAR TYPING (MLST) AND SEROLOGY TO STUDY THE EPIDEMIOLOGY OF *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* INFECTION IN A MULTISITE PIG FARM

FORLENZA J.¹, RUGNA G.², BONILAURI P.², CARRA E.², LUPPI A.², MARTELLI P.³, MERIALDI G.²

¹ Veterinario aziendale;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;

³ Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie - Università degli Studi di Parma

Parole chiave: Epidemiologia, *Brachyspira hyodysenteriae*, MLST, ELISA, sierologia
Key words: Epidemiology, *Brachyspira hyodysenteriae*, MLST, ELISA, serology

Riassunto

Un programma di controllo nei confronti della dissenteria suina (DS), specialmente in allevamenti multisito, per essere efficace deve basarsi sulla conoscenza dell'epidemiologia intra-allevamento di *Brachyspira hyodysenteriae*. Lo scopo di questo studio è stato l'identificazione delle fonti di infezione e delle vie di trasmissione dell'agente patogeno in un allevamento con DS endemica, utilizzando la sierologia e la tipizzazione molecolare (MLST) dei ceppi circolanti. L'allevamento è composto da 5 siti (A, B, C, D, E) tra loro strettamente correlati funzionalmente; è autosufficiente e solo occasionalmente vengono comprati lattoni da un allevamento non di proprietà, considerato indenne da DS. Nell'allevamento si verificano episodi ricorrenti di dissenteria emorragica in tutti i siti eccetto A (scrofe grand-parent) e D, dove la malattia non si presenta clinicamente da almeno due anni. Il protocollo di studio ha previsto il prelievo di campioni di sangue da tutte le unità e campioni fecali e/o visceri da soggetti con sintomi di DS in un periodo di 18 mesi. Gli isolati di *B. hyodysenteriae* sono stati sottoposti a determinazione della MIC ed MLST. I campioni di sangue sono stati testati sierologicamente con un prototipo di kit ELISA in fase di sperimentazione. La MLST ha mostrato la circolazione di isolati appartenenti tutti allo stesso sequence type (ST 77). La sierologia ha rilevato positività in tutte i siti ad eccezione di E in cui erano presenti suini introdotti da fonte esterna indenne. Sulla base della storia clinica e dei risultati di laboratorio è possibile ipotizzare che le scrofe granparentali del sito A, sebbene non affette da DS, siano la probabile fonte di diffusione di *B. hyodysenteriae*. L'uso combinato di MLST e sierologia si è dimostrato un potenziale strumento per una eventuale futura implementazione di strategie di controllo aziendale nei confronti dell'infezione da *B. hyodysenteriae*.

Abstract

A successful control program for Swine dysentery (DS), especially in multisite pig herds, relies on the accurate understanding of the intra-herd epidemiology. The aim of the study was to attempt the identification of the infection's sources and the transmission patterns of *B. hyodysenteriae* in an Italian pig farm suffering from DS by using a molecular typing

method (MLST) and serology. The study was conducted in a herd based on 5 sites (A, B, C, D, E). Recurrent episodes of DS were observed, but 2 sites (A and D) have no history of DS in the last 2 years. Fecal samples were collected from pigs suffering from clinical signs of DS. Blood samples from at least 40 pigs were collected from each site. Fecal samples were cultivated for *B. hyodysenteriae* and the isolates were submitted to MLST. Two hundred blood samples were tested with a prototype of ELISA kit. The MLST results showed the circulation of isolates belonging to the same sequence type (ST 77). The ELISA test showed that *B. hyodysenteriae* antibodies were present in all groups including those without a recent history of clinical DS but in site E where pigs introduced from an DS free herd were allocated. Based on the case history and the laboratory results it is possible to hypothesize that grandparent sows site A), even though not affected by clinical DS, are the probable single source of *B. hyodysenteriae* spreading. The combined use of molecular typing and serology could be of help for the correct implementation of control strategies.

INTRODUZIONE

La dissenteria suina (DS) o dissenteria emorragica suina (Swine Dysentery) è una colite muco-emorragica causata dalla spirocheta anaerobia *Brachyspira hyodysenteriae*, a trasmissione oro-fecale (Hampson *et al.*, 2006; Taylor & Alexander, 1971). Questa patologia è diffusa in tutti i Paesi con allevamento intensivo del suino ed ha un impatto molto alto, determinando ingenti perdite economiche dovute alla mortalità e alla riduzione delle performance produttive. La DS è una patologia multifattoriale, in cui entrano in gioco variabili come l'età dei suini, lo stress, l'acidità dello stomaco, la dieta, la virulenza dei ceppi di *B. hyodysenteriae* (Jacobson *et al.*, 2004). Il sistema produttivo è un fattore sicuramente molto importante: in allevamenti a ciclo chiuso il patogeno può persistere in scrofe infette endemicamente, che superano l'infezione e sviluppano un'immunità protettiva ma che ancora eliminano il patogeno con le loro feci (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013). Altrettanto importanti sono il tipo di pavimentazione e i livelli di biosicurezza (Mirko *et al.*, 2006).

Il trattamento terapeutico della DS consiste principalmente nell'uso di antibiotici. I più utilizzati nell'Unione Europea sono le pleuromutiline (tiamulina e valnemulina), i macrolidi (tilosina e tilvalosina) e la lincomicina. L'emergere di ceppi con ridotta suscettibilità a uno o più antibiotici, evidenziato ormai in diversi Paesi europei (Hidalgo *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2004) ed in Italia (Bonilauri *et al.*, 2004; Merialdi *et al.*, 2006; Magistrali *et al.*, 2010), riduce però le opzioni disponibili per il controllo della DS e dovrebbe allertare i veterinari e gli allevatori sulla necessità di un approccio più strategico al problema. Un efficiente programma di controllo, specialmente in grandi allevamenti integrati, dovrebbe basarsi sull'accurata conoscenza dell'epidemiologia intra-allevamento della malattia, in particolare sull'identificazione dei fattori di rischio e delle fonti di infezione e sui *pattern* di circolazione del patogeno tra le varie unità dell'allevamento.

A questo scopo, le tecniche di tipizzazione molecolare e l'utilizzo della sierologia possono rivelarsi uno strumento utile. Recentemente è stata messa a punto da La *et al.* (2009) la tecnica di tipizzazione Multi Locus Sequence Typing (MLST), una metodica con alto potere discriminante e con buona riproducibilità dei risultati. Per quanto riguarda la sierologia, la colonizzazione da *B. hyodysenteriae* induce una forte risposta immunitaria sistemica che può durare anche 17 settimane (Ferne *et al.*, 1983), e quindi la identificazione di anticorpi circolanti può dare una dimostrazione indiretta dell'esposizione al patogeno e la sierologia può essere uno strumento valido almeno per determinare lo stato sanitario di gruppo.

Lo scopo del presente studio è stato innanzitutto quello di comprendere l'epidemiologia

della DS in un allevamento integrato composto da 5 siti, strettamente correlati tra loro funzionalmente, ma caratterizzato dall'assenza di forma clinica in alcuni di essi. L'allevamento è autosufficiente e solo occasionalmente vengono comprati dei suini da un allevamento non di proprietà. Per il raggiungimento dell'obiettivo è stato utilizzato un approccio epidemiologico innovativo, basato sull'utilizzo associato di una tecnica di tipizzazione molecolare (MLST) e della sierologia, in modo da valutare la possibilità di un supporto razionale alla definizione di eventuali future strategie di controllo o eliminazione di *B. hyodysenteriae* in azienda. Per la stessa finalità è stata determinata la suscettibilità agli antibiotici dei ceppi isolati mediante determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).

MATERIALI E METODI

- *Descrizione dell'azienda e stato sanitario nei confronti della DS*

La descrizione dei flussi di suini tra i siti dell'allevamento è rappresentata schematicamente nella Figura 1.

Sito A

È la scrofaia principale dal punto di vista funzionale dell'azienda. Ospita 250 scrofe granparentali a ciclo aperto, per la produzione di scrofette ibride di 6 kg destinate all'allevamento B e saltuariamente anche all'allevamento C; i controssessi vengono ingrassati negli allevamenti D ed E. La pavimentazione in ingrasso è piena all'interno, con parquet esterno fessurato. L'alimentazione è liquida con acqua. In questo allevamento non si hanno casi conclamati di dissenteria emorragica da più di due anni.

Sito B

Ospita 750 scrofe a ciclo semichiuso. La quasi totalità dei suini prodotti viene ingrassata *in situ*, mentre una piccola quantità in esubero viene spostata per l'ingrasso nell'allevamento E. L'allevamento non è di recente costruzione, infatti alcuni capannoni risalgono ai primi anni '60. Le scrofe sono allevate su pavimento pieno, in ingrasso c'è un fessurato cosiddetto "autopulente". L'alimentazione in ingrasso è liquida con siero di Parmigiano Reggiano.

Questo sito, per quanto riguarda il controllo della DS, risulta il più problematico. La patologia si manifesta ciclicamente interessando tutte le categorie di animali, comprese le scrofe in fase di accrescimento e i soggetti in svezzamento. Gli episodi clinici si presentano però più frequentemente nei soggetti in ingrasso tra i 100 e i 170 kg.

Sito C

Ospita 430 scrofe a ciclo semichiuso; una metà circa dei suini prodotti viene ingrassata in questo sito, il resto viene spostato al peso di 40-50 kg e portato al peso di macellazione nel sito E. In questo allevamento viene attuato un piano di autorimonta e saltuariamente viene introdotto qualche lotto di scrofette dal sito A. La pavimentazione è totalmente fessurata in tutte le fasi, tranne nei box in gestazione dove c'è una parte di pavimento pieno. L'alimentazione in ingrasso è liquida con siero di Parmigiano Reggiano. Dal punto di vista clinico la DS in questo sito si manifesta più di rado e quasi sempre nelle ultime fasi dell'ingrasso tra i 100 e i 170 kg, molto più raramente nelle scrofe o nei suini in accrescimento.

Sito D

È un piccolo ingrasso da 1200 posti dove vengono portati al peso di macellazione i controssessi dell'allevamento A e qualche partita dell'allevamento B. La pavimentazione è a pavimento pieno con fessurato esterno. L'alimentazione in ingrasso è liquida con acqua. Dal punto di vista della DS non ci sono episodi da almeno due anni.

Sito E

E' un ingrasso di circa 5500 posti, dove vengono accasati lattoni da più provenienze: dai siti A, B e C e da una provenienza esterna dichiarata indenne da DS. La pavimentazione è pavimento pieno con fessurato esterno. L'alimentazione in ingrasso è liquida con siero di Parmigiano Reggiano. Dal punto di vista della clinica ci sono periodicamente episodi di DS su tutte le provenienze, con insorgenza precoce ad eccezione dei suini provenienti dall'allevamento indenne, dove la malattia si manifesta più tardivamente (sempre dopo i 100 kg).

Allevamento Esterno (non di proprietà)

E' una scrofaia che fornisce lattoni ad elevato standard sanitario per l'ingrasso E. E' dichiarata indenne da DS.

Gestione sanitaria aziendale nei confronti della DS

Il protocollo standard di gestione della dissenteria emorragica prevede la somministrazione di mangime medicato a base di lincomicina cloridrato. Questa molecola viene impiegata nonostante il test di Concentrazione Minima Inibente (MIC) la indichi come "non efficace", ma ai dosaggi che si riescono a raggiungere rispettando le registrazioni del farmaco si ottengono buoni risultati. Il protocollo d'intervento è prevalentemente terapeutico, poichè la metafilassi non ha dimostrato buona efficacia e prevede la somministrazione di lincomicina cloridrato alla concentrazione di 495 ppm per 5-7 gg. Terapie più lunghe non hanno mai mostrato un vantaggio maggiore ed aumentano i costi sanitari.

Protocollo di studio ed esami di laboratorio

Il protocollo di studio ha previsto la raccolta di campioni biologici per l'isolamento di ceppi di *B. hyodysenteriae* dai siti colpiti da DS, con la finalità di determinare la MIC e studiare le correlazioni epidemiologiche degli isolati mediante tipizzazione molecolare. A tale scopo sono stati prelevati campioni fecali direttamente dall'ampolla rettale di soggetti colpiti da dissenteria. In taluni casi sono stati esaminati animali venuti a morte, sui quali gli accertamenti di laboratorio sono stati condotti da contenuto cecale, nel caso di lesioni anatomico-patologiche riferibili a DS.

Sono stati inoltre prelevati campioni di sangue per l'evidenziazione della circolazione di *B. hyodysenteriae*. In particolare sono stati campionati i 2 siti (A, D) con anamnesi negativa per DS ed un sito (B) con diagnosi batteriologica di DS; quest'ultimo, campionato in due occasioni, per valutare la corretta rilevazione di gruppi infetti da parte del kit ELISA. Per ogni sito è stata scelta una numerosità campionaria che permettesse di rilevare almeno un animale sieropositivo con una prevalenza attesa del 7% e un livello di confidenza del 95% (La *et al.*, 2009b). Nel sito E, un gruppo di suini provenienti dall'allevamento esterno e stabulati in ambiente separato fisicamente da quello dei suini di provenienza interna, è stato testato sierologicamente due volte durante il periodo di accrescimento (50 kg/p.v. e 100 Kg/p.v.).

Esami batteriologici e sierologici: i campioni fecali sono stati coltivati su BAM-agar e le colonie caratterizzate da emolisi completa sono state confermate con una PCR specie-specifica (La *et al.*, 2003). I campioni di sangue sono stati analizzati col kit PrioCHECK® Brachyspira Ab porcine ELISA (Prionics AG, Switzerland).

Suscettibilità agli antibiotici: gli isolati di *B. hyodysenteriae* sono stati testati mediante kit VetMIC™ Brachy SVA (ver. 2) nei confronti delle pleuromutiline.

Tipizzazione molecolare: per ciascun ceppo di *B. hyodysenteriae* isolato sono stati analizzati 7 degli 8 loci descritti in precedenza da Råsbäck *et al.* (2007), con il protocollo descritto da Bonilauri *et al.* (2012). A ciascun isolato è stato assegnato un ST in accordo col suo profilo allelico. Il numero di ST è stato assegnato confrontando i profili del database

mondiale dei profili MLST di *B. hyodysenteriae* (<http://pubmlst.org/analysis/>).

Analisi statistica: la prevalenza sierologica osservata nei vari siti campionati è stata espressa come media con i rispettivi limiti di confidenza al 95%, calcolati secondo Sheskin DJ (2004). Le differenze tra le prevalenze osservate nei vari allevamenti sono state testate tramite test χ^2 con livello di significatività $p < 0.05$.

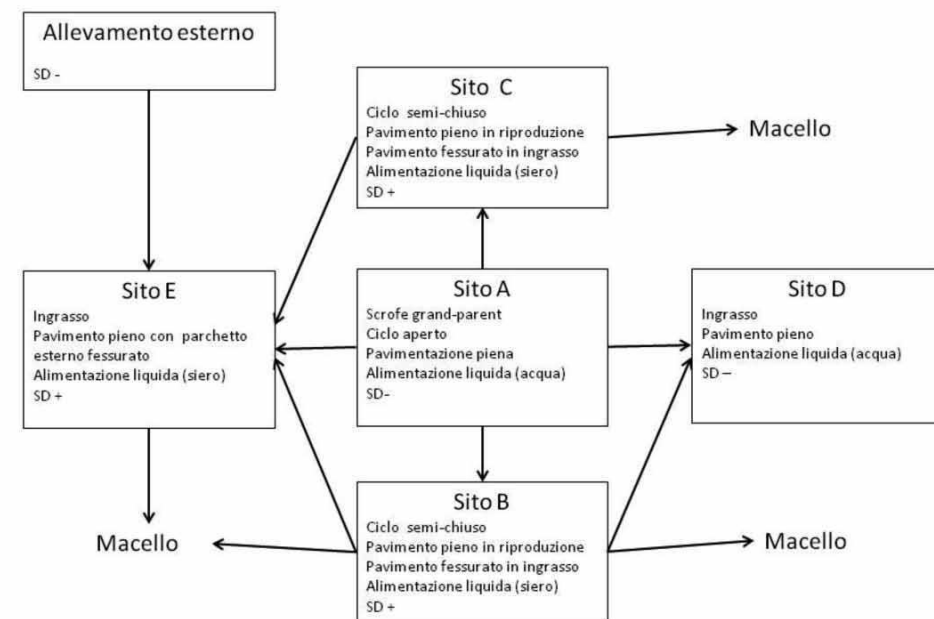


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'allevamento e del flusso di suini
Figure 1. Farm structure and pig flow

RISULTATI

Lo studio ha avuto una durata di 18 mesi (da Aprile 2011 ad Ottobre 2012). In questo periodo sono stati prelevati complessivamente 13 campioni fecali da altrettanti casi clinici e sono stati eseguiti esami batteriologici su 2 animali venuti a morte con sintomatologia e lesioni riferibili a DS. Come mostrato dalla Tabella 1, sono stati prelevati campioni da tutti i siti con anamnesi positiva per la forma clinica di DS (B, C, E). I campioni del sito E si riferiscono al settore in cui sono allevati gli animali provenienti dai siti interni all'allevamento (B e C), mentre il gruppo di suini provenienti dall'allevamento esterno non ha manifestato sintomatologia riferibile a DS. Dai 13 campioni è stato possibile isolare 9 ceppi di *B. hyodysenteriae* e tutti gli isolati, tipizzati tramite MLST, sono risultati appartenenti allo stesso ceppo (ST 77). La maggioranza degli isolati (7/9) sono risultati resistenti alle pleuromutiline (MIC >4 µg/ml). Per quanto riguarda la sierologia sono stati prelevati in totale 223 campioni di sangue (tabella 2). E' stata rilevata sieropositività in tutti i siti campionati, inclusi il sito A e il sito D, che hanno storia negativa per DS. Non è stata rilevata sieroconversione nel gruppo di animali del sito E proveniente dall'allevamento esterno e confinato in un capannone separato dai soggetti di provenienza interna.

Ceppo	Data campionamento	Campione	Sito campione/ sito provenienza	Esito	Suscettibilità pleuromutiline	ST	adh	alp	est	gdh	glpk	pgm	thi
1	15/04/2011	Feci	E/B	+	R	77	10	11	17	22	22	11	13
2	15/04/2011	Carcassa	E/B	+	R	77	10	11	17	22	22	11	13
3	19/04/2011	Feci	C	+	R	77	10	11	17	22	22	11	13
4	19/04/2011	Carcassa	C	Nc									
5	28/04/2011	Feci	E/C	+	R	77	10	11	17	22	22	11	13
6	17/06/2011	Feci	E/B	+	R	77	10	11	17	22	22	11	13
7	08/07/2011	Feci	E/B	Ne									
8	28/12/2011	Feci	B	+	R	77	10	11	17	22	22	11	13
9	24/07/2012	Feci	E	+	S	77	10	11	17	22	22	11	13
10	25/07/2012	Feci	B	+	R	77	10	11	17	22	22	11	13
11	26/09/2012	Feci	B	Nc									
12	28/09/2012	Feci	E/C	+	S	77	10	11	17	22	22	11	13
13	05/10/2012	Feci	E/C	Nc									

Tabella 1. Risultati batteriologici, della MLST e della suscettibilità alle pleuromutiline dei ceppi di *B. hyodysenteriae*

Ne: tipizzazione non eseguita

Nc: coltura negativa

Table 1. Bacteriological, MLST and pleuromutilines susceptibility results of the *B. hyodysenteriae* strains

Ne: typing not executed

Nc: negative culture

Data prelievo	Sito	N° capi presenti	Note	Sistema produttivo	N° testati	N° positivi	Clinica DS	Prevalenza (IC 95%)
09/01/2013	A	230 scrofe		ca	43	10	-	22.5% (12.5%-36.3%)
04/02/2013	D	1200 maiali		in	40	5	-	12.5% (5.46%-26.1%)
04/02/2013	B	750 scrofe	riproduttori (casuale)	ca	40	8	+	20.0% (10.5%-34.8%)
03/04/2013	B	750 scrofe	solo scrofette	ca	41	9	+	21.9%(12.0%-36.7%)
30/04/2013 30/07/2013	E	5500 maiali	provenienza esterna indenne da DS	in	59 (40+19)	0	-	0%(0.0%-6.1%)

Tabella 2. Risultati sierologici

ca : ciclo aperto

in: ingrasso

Table 2. Serologic results

ca: farrow-to-wean system

in: wean-to-finish system

Nessuna differenza statistica è stata osservata tra gli allevamenti A, B e D in termini di prevalenza sierologica. Il gruppo di suini esaminato nel sito E presenta, in base al piano di campionamento sviluppato, una prevalenza cumulativa massima del 6.1%, significativamente inferiore rispetto agli altri siti dell'allevamento ($p < 0.05$).

DISCUSSIONE

Durante il periodo di studio, si sono verificati diversi episodi di malattia nei siti dell'allevamento, permettendo di raccogliere isolati di *B. hyodysenteriae* da tutte le unità dell'allevamento storicamente colpite da DS e consentire di studiarne la correlazione epidemiologica. I siti A e D hanno invece continuato ad essere liberi dalla forma clinica di DS, nonostante siano correlati funzionalmente al resto delle unità dell'azienda. Un aspetto clinico interessante è rappresentato dal fatto che nel sito E gli episodi di DS si manifestano sempre in maniera più frequente (7 episodi su 11 nel periodo di studio) rispetto agli altri siti. Sarebbe opportuna un'analisi più approfondita dei dati manageriali e strutturali per comprendere meglio questo aspetto. Il tipo di alimentazione è la variabile che contraddistingue maggiormente i siti con assenza di forma clinica di malattia; sono infatti gli unici in cui non viene somministrato il siero di latte.

Per quanto riguarda l'aspetto prettamente diagnostico, anche se il numero di campioni da carcassa è limitato e non permette di trarre delle conclusioni certe, il mancato isolamento di *B. hyodysenteriae* dai visceri di uno dei due animali deceduti con chiare lesioni da DS conferma che il campione più idoneo per la diagnosi di DS è rappresentato dalle feci muco-emorragiche di soggetti sintomatici. L'isolamento di *B. hyodysenteriae* da campioni autoptici può essere infatti reso difficoltoso dalla sensibilità del microrganismo ai fenomeni autolitici post-mortali. Anche l'analisi di campioni fecali o di tamponi rettali da animali asintomatici ha una bassa sensibilità, dovuta al fatto che tali soggetti sono eliminatori a basso titolo (Fellstrom *et al.*, 2001). I test diretti possono inoltre avere bassa sensibilità se applicati in gruppi di animali che sono sottoposti a trattamenti farmacologici. La sierologia, invece, dato che i suini infetti da *B. hyodysenteriae* manifestano una reazione anticorpale evidenziabile fino a 150 giorni p.i. (Fisher & Olander, 1981), potrebbe essere un utile strumento per la determinazione dello stato sanitario di gruppo in assenza di manifestazioni cliniche di dissenteria emorragica, come recentemente descritto in un recente lavoro di Song e colleghi (2012). L'ELISA è sicuramente una delle tecniche sierologiche più sperimentate per quanto riguarda la DS e diversi sono i componenti strutturali della cellula batterica che sono stati sperimentati per l'utilizzo come antigeni diagnostici (La *et al.*, 2009b). Il prototipo di kit ELISA utilizzato in questo studio utilizza un antigene di superficie recentemente prodotto ed è stato scelto perché i componenti strutturali di superficie, rispetto all'utilizzo di cellula intera, consentono di avere accettabili livelli di specificità (Song *et al.*, 2012). Il kit ha correttamente identificato lo stato sanitario dei suini del sito B, dove nel periodo di studio è stata più volte diagnosticata la DS con l'esame colturale. Il dato contrastante che si è cercato di indagare nell'allevamento era l'assenza di malattia nei siti A e D. Le positività sierologiche rilevate permettono di ipotizzare che anche in questi siti ci sia circolazione di *B. hyodysenteriae*, E' probabile che nel sito A, che ha contatti funzionali con tutti gli altri siti dell'allevamento, si sia instaurata una immunità di gruppo che protegge dalle forme cliniche di malattia. Le scrofe possono comunque trasmettere l'agente eziologico ai suinetti e quindi diffonderlo negli altri settori con la movimentazione delle scrofette. Ipotesi supportata dall'osservazione che nel sito A la prevalenza media osservata non differisce significativamente dal sito B dove la malattia è manifesta. Nel sito D, ingrasso di 1200 capi di consistenza, la prevalenza riscontrata non è significativamente differente rispetto al sito B

o al sito A, per cui è possibile che, durante il periodo di studio, la malattia fosse presente in forma sub-clinica e per questo non rilevata.

Il risultato della tipizzazione molecolare rileva che un solo ceppo di *B. hyodysenteriae* è presente nei 3 siti dove si manifesta la forma clinica di DS. E' quindi ipotizzabile che ci sia una circolazione endemica dello stesso ceppo derivante da una fonte di infezione interna all'azienda. Questo risultato, supportato dai risultati sierologici che confermano tra l'altro lo stato di indennità dei suini provenienti dall'allevamento esterno, lascia ipotizzare che le scrofe del sito A siano con buona probabilità la fonte di diffusione di *B. hyodysenteriae*. Un altro risultato interessante è che due isolati di *B. hyodysenteriae* sono risultati sensibili *in vitro* alle pleuromutiline, pur possedendo lo stesso profilo allelico di altri isolati risultati resistenti. Questo fenomeno è spiegabile col fatto che la popolazione di ceppi circolanti in allevamento può sviluppare la resistenza al farmaco indipendentemente in un comparto rispetto agli altri ed i ceppi che hanno sviluppato resistenza possono prevalere o meno a seconda di differenti fattori aziendali, tra cui sicuramente la selezione esercitata dall'utilizzo del farmaco in quel particolare comparto dell'azienda. Il monitoraggio della suscettibilità agli antibiotici nel tempo è quindi un aspetto importante per il controllo della DS, permettendo di indirizzare le strategie terapeutiche.

CONCLUSIONI

I dati di laboratorio raccolti in questo studio, uniti alle informazioni di tipo clinico e gestionale, hanno consentito di approfondire la situazione epidemiologica dell'allevamento nei confronti della dissenteria emorragica. In primo luogo si è potuto concludere che nell'azienda circola un ceppo clonale unico e quindi viene esclusa per il momento l'ipotesi che concorrano fonti di infezione esterne all'allevamento. In secondo luogo si è appurato che il sito che ospita le scrofe gran-parentali (sito A) e che costituisce l'apice della piramide produttiva dell'azienda non può essere considerato indenne, almeno sulla base dei dati sierologici, nonostante da molti anni non si presentino forme cliniche di malattia.

Qualora l'azienda decidesse quindi di intraprendere azioni volte alla eliminazione di *B. hyodysenteriae*, il sito delle scrofe gran-parentali sarebbe da considerare come punto di partenza della strategia di controllo. In questa ottica, la disponibilità di riproduttori indenni sarebbe la fase cruciale di un processo in cui la sierologia potrebbe rivelarsi un utile strumento, permettendo l'identificazione di fonti sicure per l'introduzione di nuovi suini in siti totalmente o parzialmente depopolati.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez-Ordóñez A., Martínez-Lobo F.J., Arguello H., Carvajal A., Rubio P. (2013) Swine Dysentery: Aetiology, Pathogenicity, Determinants of Transmission and the Fight against the Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 1927-1947
- Bonilauri P., Merialdi G., Calzolari M., Luppi A., Dottori M. Incremento del riscontro di ceppi multiresistenti di *Brachyspira hyodysenteriae* in allevamenti suini del nord Italia. 2004. Atti del XXX convegno della Società di Patologia ed Allevamento dei Suini. Salsomaggiore Terme (PR) 25-26 Marzo 2004, 181-186.
- Bonilauri P., Carra E., Biasi G., Bergamini F., Corpus F., Magistrali C., Luppi A., Gherpelli Y., Rugna G., Cucco L., Dottori M., Merialdi G. (2012) Genotipizzazione di ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati in Italia attraverso il sequenziamento Multilocus Sequence Typing (MLST). Atti della Società Italiana di patologia e allevamento suino (SIPAS). XXXVIII Meeting Annuale, Parma, 205-215

- Fellstrom, C., Zimmerman, U., Ispan, A. and Gunnarsson, A. (2001) The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev* 2, 37-43.
- Fernie D.S., Ripley P.H., Walker P.D. (1983) Swine dysentery: protection against experimental challenge following single dose parenteral immunisation with inactivated *Treponema hyodysenteriae*. *Res Vet Sci* 35:217-221.
- Fisher L.F., Olander H.J. (1981) Shedding of *Treponema hyodysenteriae*, transmission of disease, and agglutinin response to pigs convalescent from swine dysentery. *Am J Vet Res*, 42(3):450-465
- Hampson D.J. (2006). *Brachyspiral colitis*. In: Zimmerman J.J., Krieger L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. (Eds.) *Diseases of Swine* 10th edition. Wiley-Blackwell, Oxford UK pp. 680-696
- Hidalgo A., Carvajal A., Vester B., Pringle M., Naharro G., Rubio P. (2011) Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55:3330-3337
- Jacobson M., Fellström C., Lindberg R., Wallgren P., Jensen-Waern M. (2004) Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol April 2004 vol. 53 no. 4 273-280*
- Karlsson M., Aspan A., Landen A., Franklin A. (2004) Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J Med Microbiol* 2004, 53:281-285
- La T., Phillips N.D., Harland B.L., Wanchanthuek P., Bellgard M.I., Hampson D.J. (2009). Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 138: 330-338.
- La T, Phillips ND, Hampson DJ. 2009b. Evaluation of recombinant Bhlp29.7 as an ELISA antigen for detecting pig herds with swine dysentery. *Vet Microbiol* 133:98-104.
- La T., Phillips N.D., Hampson D.J. (2003) Development of duplex PCR assay for detection of *brachyspira hyodysenteriae* and *brachyspira pilosicoli* in pig feces. *J Clin Microbiol* 41: 3372-3375
- Magistrali C.F., Cucco L., D'Avino N., D'Angelo G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Merialdi G. - Valutazione della sensibilità ad antimicrobici di *B. hyodysenteriae*: confronto tra due metodi. Atti XXXVI Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed allevamento dei suini, 25-26 Marzo 2010, Montichiari (BS), pp337-340
- Merialdi G., P Bonilauri, M Dottori. Presence of tiamulin and valnemulin resistant *B. hyodysenteriae* strains in Italian pig herds. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006-Volume 2: p 455
- Mirko C.P., Bilkei G. (2006) Risk factors associated with *Brachyspira hyodysenteriae* PCR-positivity in East-European pig production units. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2006 Jun 1;131(11):398-402.
- Song Y., Frey B., Hampson D.J. (2012) The use of ELISAs for monitoring exposure of pig herds to *Brachyspira hyodysenteriae*. *BMC Vet Res*, 8: 6
- Sperling D., Smola J., Cizek A. (2011) Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Vet Rec* 2011, 168:215
- Sheskin DJ (2004) Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. 3rd ed. Boca Raton: Chapman & Hall /CRC.
- Taylor D.J., Alexander T.J.L. (1971) The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J* 127:58-61.

**PREVALENZA, ANTIBIOTICO-RESISTENZA E
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR 4,[5], 12:i:-
ISOLATA DA SUINI AL MACELLO E DA CAMPIONI PATOLOGICI**

***PREVALENCE, ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF SALMONELLA ENTERICA SUBSP.
ENTERICA SEROVAR 4,[5], 12:i:-
ISOLATED FROM SLAUGHTERED PIGS AND
PATHOLOGICAL SAMPLES***

ROSAMILIA A., CARRA E., BONILAURI P., GHERPELLI Y., CORPUS F.,
MORGANTI M., RUGNA G., ROSIGNOLI C., NIGRELLI A., D'INCAU M.,
BIASI G., DOTTORI M., MERIALDI G., LUPPI A.

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

Parole chiave: *Salmonella*, suini, prevalenza, antibiotico-resistenza, PFGE, MLVA

Key Words: *Salmonella*, pigs, prevalence, antibiotic resistance, PFGE, MLVA

Riassunto. Da Febbraio a Novembre 2013, 41 partite di suini regolarmente macellati, provenienti da altrettanti allevamenti del Nord Italia sono state campionate attraverso il prelievo di linfonodi ileocecali (30 suini per partita), per un totale di 1230 suini campionati. *Salmonella spp.* è stata isolata nel 18,78% dei suini macellati e 21 sierotipi sono stati identificati. *S. 4,[5],12:i:-* è risultato il sierotipo maggiormente isolato (4,47%), seguito dalla *S. Rissen* (3,25%) e *S. Derby* (2,68%) mentre *S. Typhimurium* ha presentato una prevalenza al macello soltanto dello 0,74%.

Novantaquattro ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* (55 isolati dal precedente campionamento al macello e 39 isolati da campioni patologici provenienti da 30 allevamenti) sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di 14 antibiotici. Il 90,42% degli isolati è risultato essere multiresistente evidenziando la circolazione di due fenotipi prevalenti: ASSuT (48,9% dei ceppi) ed ACSSuT (41,5% dei ceppi).

Due metodiche di genotipizzazione batterica sono state applicate per valutare la diversità genetica dei ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* appartenenti ai due gruppi (macello e allevamento): il metodo Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e il metodo Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). La PFGE ha individuato 40 differenti genotipi, mentre la metodica MLVA ne ha individuati 28. Combinando insieme i diversi profili ottenuti dalle due metodiche il potere discriminante aumenta in modo significativo (Indice di Diversità di Simpson 0,97 $p < 0.001$). I risultati del nostro studio confermano l'alta prevalenza di *Salmonella spp.* nei suini macellati e sottolineano l'elevata incidenza della *S. 4,[5],12:i:-* che si conferma come sierotipo preponderante. I dati di antibiotico-resistenza ottenuti dai ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* evidenziano la circolazione di due principali profili fenotipici di multi resistenza (ASSuT ed ACSSuT).

Abstract. From February to November 2013, 1230 ileocolic lymph nodes were randomly collected from heavy pigs (9-10 months old, 160 kg BW) belonging to 41 batches coming from as many herds.

Salmonella spp. was isolated from 231 out of 1230 lymph nodes (18,78% CI95% 16,60%-20,96%) and 38 batches out of 41 were positive. A total of 21 different serovars of *Salmonella*

were identified. *S.* 4,[5],12:i:- was the most prevalent serovar (4,47%) followed by *S.* Rissen (3,25%) and *S.* Derby (2,68%) while *S.* Typhimurium showed a prevalence of 0,74%. Fifty-five strains of *S.* 4,[5],12:i:- isolated during the survey at the slaughterhouse and 39 strains of *S.* 4,[5],12:i:- isolated from clinical pigs were tested for their susceptibility to 14 antimicrobials. All strains of *S.* 4,[5],12:i:- showed resistance to at least one antimicrobial and 90,42% of them showed multiresistance (resistance to 4 or more antibiotics). The most common pattern of resistance profile was the ASSuT profile (48,9% of strains) followed by the ACSSuT profile (41,5% of strains). Strains were characterized by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). PFGE analysis generated 40 different profiles while MLVA showed 28 different profiles. Combining the two methods the discriminatory power increased (Simpson's index of diversity 0,97 $p < 0,001$). The combination of different molecular methods can be valuable to characterize *Salmonella* strains and to investigate their epidemiological relationship. The prevalence of *Salmonella* serovars in this study showed an overall decline of serovar Typhimurium. To some extent this reduction has been counteracted by an increase in prevalence of the emerging serovar 4,[5],12:i:-, characterized by isolates with multidrug resistance (ASSuT and ACSSuT profiles) as described in several European countries.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Salmonella* rappresenta una delle principali cause di tossinfezione alimentare nell'uomo (EFSA, 2012) e gli alimenti di origine animale, compresi quelli di origine suina (Pires et al., 2011) sono ritenuti responsabili di circa il 10-20% dei casi di salmonellosi nell'uomo (EFSA, 2010). Pertanto una migliore conoscenza della prevalenza di *Salmonella* nel comparto suinicolo inteso il più possibile nella sua interezza, dall'allevamento alla macellazione, fino al prodotto finito pronto all'acquisto ed al consumo, può contribuire a meglio impostare programmi di riduzione del rischio associato al consumo dei prodotti di origine suina e contribuire in modo determinante ad una maggiore sicurezza in termini di salute pubblica. Con il Regolamento (CE) n. 2160/2003 si richiede agli stati membri di stabilire programmi di controllo nazionali, mirati ad una riduzione della prevalenza dell'infezione da *Salmonella* e altri agenti zoonotici in diverse specie animali, tra cui il suino, indicando come punto di intervento principale la produzione primaria. Paesi come la Danimarca, l'Inghilterra, l'Olanda e la Germania hanno stabilito piani di controllo nazionali riguardanti l'infezione da *Salmonella* nel suino, mentre altri Paesi, inclusa l'Italia, sono nella fase di raccolta dati ed informazioni relative all'epidemiologia dell'infezione. Le peculiarità che caratterizzano l'allevamento suino italiano, come l'utilizzo di grandi quantità di alimentazione liquida e la durata del periodo di ingrasso maggiore rispetto a quello osservato negli altri Stati europei, rappresenta un importante fattore di rischio, confermato anche dai dati riportati dall'EFSA, dove si osserva una maggiore percentuale di suini portatori del germe all'età di macellazione in Italia (16,5%) rispetto a quello che si può osservare per gli altri Stati europei (10,3%) (EFSA, 2008).

Fin dalla metà degli anni '90 si è osservata la presenza del sierotipo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierotipo 4,[5],12:i:- nota come variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium, perché non esprime l'antigene flagellare H di fase due e la sua frequenza di isolamento è via via aumentata fino ai giorni attuali sia in campioni clinici umani che in una vasta gamma di specie animali allevati ed in alimenti di origine animale. In Europa, il pericolo costituito dalla variante monofasica è principalmente associato al consumo di carne di maiale contaminato,

anche se altre sorgenti quali alimenti di origine avicola o bovina e la convivenza con animali da compagnia sono stati riportati tra le sorgenti di questo particolare sierotipo (Hauser et al., 2010). In Italia ed in particolare in Emilia Romagna dove è presente un sistema di sorveglianza regionale sulle salmonellosi umane, il sierotipo più frequentemente isolato dal 2012 è divenuto la variante monofasica, che ha abbondantemente superato per frequenza la *S.* Typhimurium e la *S.* Enteritidis.

A quanto appena esposto si aggiunga che la frequenza con la quale si verificano fenomeni di antibiotico-resistenza fra ceppi di *Salmonella* spp., come dimostrato in Europa, Nord America ed Asia ha subito nel corso degli ultimi anni un drammatico incremento (Graziani et al., 2008; Hopkins et al., 2010; Hur et al., 2011). Infatti, nell'ultima decade si è registrato un aumento globale dell'antibiotico-resistenza nei confronti di molecole come l'ampicillina (A), la streptomina (S), i sulfamidici (Su) e la tetraciclina (T) (ASSuT) in salmonelle di rilevanza clinica per l'uomo, quali *S.* 4,[5],12:i:-, *S.* Typhimurium, e *S.* Rissen (Alcaline et al., 2007; Antunes et al., 2011; EFSA, 2013; Hauser et al., 2010; Meakins et al., 2008). In numerosi Paesi europei, tra cui la Spagna, l'Inghilterra, il Galles, la Germania, la Francia e anche l'Italia, studi su ceppi di *S.* Typhimurium e *S.* 4,[5],12:i:-, hanno evidenziato un'alta prevalenza di ceppi presentanti il profilo di resistenza ASSuT (ceppi tetra resistenti) (Dionisi et al., 2009; Hopkins et al., 2010).

I determinanti genetici della resistenza agli antibiotici sono ad oggi noti ed è possibile confermarne la presenza nei ceppi fenotipicamente rilevati come resistenti ad uno o più determinati agenti antimicrobici. Inoltre, la tipizzazione molecolare dei ceppi di *Salmonella* isolati sia in sede di macellazione che in campioni provenienti dalla produzione primaria e raccolti in allevamento risulta ad oggi possibile tramite tecniche di genotipizzazione batterica quali la Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) e la Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). In termini pratici queste metodiche forniscono informazioni per impostare studi di epidemiologia molecolare in grado di aiutare la comprensione da dove e come il suino entra in contatto con il germe durante la sua vita produttiva che termina con la macellazione.

In quest'ottica rientra il lavoro che andiamo qui a presentare e che ha tra gli obiettivi primari quello di contribuire alla raccolta dati nazionale rivolta alla stima della reale prevalenza dei sierotipi di *Salmonella* in suini italiani all'età di macellazione con particolare riferimento alla variante monofasica. Nel presente lavoro saranno presentati i risultati di un anno di monitoraggio al macello volto al rilevamento di *Salmonella* da linfonodi di suini regolarmente macellati. Inoltre verranno presentati i risultati ottenuti dalla genotipizzazione e valutazione dei pattern di resistenza antibiotica sui ceppi sierotipizzati come varianti monofasiche *S.* 4,[5],12:i:-.

Infine presenteremo i risultati della comparazione genetica e fenotipica (in termini di resistenza agli antimicrobici) tra i ceppi di variante monofasica isolati in sede di macellazione e da campioni biologici provenienti dalla produzione primaria.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Da Febbraio a Novembre 2013, 41 partite di suini regolarmente macellati, provenienti da altrettanti allevamenti del Nord Italia sono state campionate attraverso il prelievo di linfonodi ileocecali (30 suini per partita), per un totale di 1230 suini campionati. Ogni partita risultava composta da circa 135 suini (160-170 kg di peso corporeo) di 9-10 mesi d'età. I campioni

una volta prelevati sono stati trasportati alla Sezione di Reggio Emilia (IZSLER) dove sono stati sottoposti ad indagine microbiologica per la ricerca di *Salmonella* spp.

Nello stesso periodo di riferimento, lo studio è stato integrato dalla raccolta di ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* isolati da materiale patologico (intestino e feci) proveniente da suini di età compresa tra i 28 giorni ed i 4 mesi appartenenti a 30 allevamenti della medesima area geografica.

Isolamento batterico

Per l'isolamento di *Salmonella* spp. sia dai linfonodi ileocecali prelevati al macello che dai campioni biologici provenienti dalla produzione primaria è stata utilizzata la procedura ISO 6579:2002/Amd 1 Annex D:2007 (ISO, 2007). Per quanto riguarda i campioni di linfonodi questi sono stati processati come riportato da Mainar-Jaime et al. (2012). Brevemente, i linfonodi sono stati decontaminati esternamente previa immersione in alcool assoluto, flambati e frantumati, dopo di che 10 grammi di campione sono stati diluiti 1:10 in acqua peptonata tamponata (APT). Per quel che riguarda campioni fecali o di visceri di suino provenienti dalla produzione primaria, un grammo di feci o di visceri è stato posto in arricchimento con 10 ml di APT. Dopo l'arricchimento primario a 37°C ± 1 per 18 ± 2 ore, in entrambi i casi 0,1 ml di brodocoltura è stato trasferito su terreno semisolido Modifield Semisolid Rappaport-Vassillidis (MRSV) e incubate a 41.5°C ± 1°C per 24 ± 3 ore. Le piastre negative di MRSV sono state lasciate ad incubare per ulteriori 24 ± 3 ore. Un'ansata della presunta crescita di *Salmonella* è stata trasferita in due differenti terreni selettivi, Xylose-Lysine-Deoxycholate agar (XLD) e Brilliant Green agar (BGA), e incubate a 37°C ± 1°C per 24 ± 3 ore. Le colonie presentanti morfologia compatibile con *Salmonella* sono state sottoposte a conferma biochimica e successivamente sierotipizzate.

Tipizzazione Sierologica

La caratterizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* spp. è stata eseguita mediante agglutinazione rapida su vetrino per la determinazione degli antigeni somatici (O), mentre per la determinazione degli antigeni flagellari (H) è stato applicato il metodo di agglutinazione lenta a caldo secondo la tecnica Spicer (1956), modificata da Edwards (1962) e Morris et al. (1972). Gli esiti delle determinazioni degli antigeni sono stati poi impiegati per la caratterizzazione sierologica definitiva per la quale è stato utilizzato lo schema di Kauffmann-White-Le Minor (Grimont and Weill, 2007).

Test di sensibilità agli antimicrobici

I ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* appartenenti ai due gruppi (macello e allevamento) sono stati testati per la sensibilità antimicrobica. Quest'ultima è stata determinata valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC) con il metodo della microdiluzione in piastra, utilizzando un prodotto commerciale (SensitreO, TREK Diagnostic Systems Inc). Gli antibiotici testati con i rispettivi *ranges* di diluizione sono stati i seguenti: ampicillina (A), 0,5-32 mg/ml; cloramfenicolo (C), 2-64 mg/ml; streptomina (S), 2-128 mg/ml; sulfametossazolo (Su), 8-1024 mg/ml; tetraciclina (T), 1-64 mg/ml; gentamicina (GEN), 0,25-32 mg/ml; florfenicolo (FFN), 2-64 mg/ml; kanamicina (KAN), 4-128 mg/ml; trimetoprim (TMP), 0,5-32 mg/ml; acido nalidixico (NAL), 4-64 mg/ml; colistina (COL), 2-4 mg/ml; cefotaxime (FOT), 0,06-4 mg/ml; ceftazidime (TAZ), 0,25-16 mg/ml; ciprofloxacina (CIP), 0,008-8 mg/ml. Gli isolati sono stati classificati come resistenti (R), sensibili (S) e intermedi (I) agli antimicrobici in accordo con i *breakpoints* proposti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) e dal Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

(2013). Nella valutazione dei pattern di resistenza i ceppi che hanno fornito un risultato intermedio ad una determinata molecola sono stati raggruppati tra gli isolati sensibili a quella particolare molecola. Controlli di qualità sono stati eseguiti impiegando due ceppi batterici di referenza: *Escherichia Coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLVA di ceppi di *S. 4,[5],12:i:-*

Due metodiche di genotipizzazione batterica sono state applicate per valutare la diversità genetica dei 94 stipiti di *S. 4,[5],12:i:-* appartenenti ai due gruppi (macello e allevamento): il metodo PFGE e il metodo MLVA.

La PFGE è stata eseguita con l'enzima di restrizione Xba-I secondo il protocollo standard adottato da PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/>). Ad ogni seduta di ceppi da esaminare è stato incluso nell'analisi il ceppo di riferimento *Salmonella* Braenderup H9812 come controllo. Al termine dell'analisi l'immagine del gel ottenuto era sottoposta ad analisi con il Software BioNumerics versione 6.6. A ciascun ceppo è stato attribuito un genotipo PFGE identificato da un codice specifico per il profilo di bande ottenuto.

Per la caratterizzazione mediante il protocollo MLVA è stato applicato un metodo basato sull'analisi di 5 loci genici: STTR9-STTR5-STTR6-STTR10pl-STTR3 secondo Lindstedt et al. (2004). I prodotti di amplificazione dei 5 loci sono stati sottoposti a separazione capillare mediante sequenziatore automatico Beckman Coulter (USA) della serie CEQ. I dati grezzi della separazione capillare sono stati analizzati mediante il programma "Default Fragment Analysis STTR" partendo dal modulo Fragments del Software CEQ 8000 (versione 8.0). Per ogni ceppo è risultato visibile nell'elettroferogramma la presenza di un picco colorato per ciascun locus genico indagato, con indicata la dimensione in nucleotidi (nt). Dalla dimensione dei frammenti è stato possibile ricavare il numero di "tandem repeats" (TRs) presenti in ciascun locus secondo quanto specificato da Larsson et al. (2009) e quindi dedurre il profilo MLVA come successione di 5 numeri corrispondenti al numero di TRs presenti nei loci STTR9-STTR5-STTR6-STTR10pl-STTR3 rispettivamente. Per ciascun ceppo il profilo MLVA ottenuto è stato importato come carattere discreto nel database del software BioNumerics.

Analisi statistica

I ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* sono stati suddivisi in classi di multiresistenza agli antibiotici. La differente distribuzione di queste classi di resistenza tra i ceppi isolati nei linfonodi campionati al macello ed i ceppi isolati da campioni della produzione primaria è stata testata tramite test χ^2 con $p < 0.01$.

Il potere discriminante tra i ceppi in esame delle due metodiche di genotipizzazione PFGE ed MLVA sia separatamente sia combinando i dati emersi da entrambe le metodiche, è stato valutato attraverso il calcolo dell'Indice di Diversità di Simpson (<http://darwin.phylviz.net/ComparingPartitions/>).

RISULTATI

Prevalenza e sierotipi di *Salmonella* spp. isolati da linfonodi al macello.

Salmonella spp. è stata isolata in 231 dei 1230 (18,78%, 95%CI: 16,60%-20,96%) linfonodi ileocecali campionati da partite di suini macellati (Tabella 1).

Tabella 1. Distribuzione dei sierotipi di *Salmonella enterica* isolati dai linfonodi ileocecali dei suini macellati.

Table 1. Distribution of *Salmonella enterica* serotypes detected of ileocecal lymph nodes in slaughter pigs.

Sierotipi di <i>Salmonella enterica</i> isolati	LNI positivi (n)	% prevalenza
4,[5],12:i:-	55	4,47
Rissen	40	3,25
Derby	33	2,68
Oranienburg	19	1,55
Goldcoast	18	1,46
London	17	1,38
Branderburg	12	0,98
Typhimurium	9	0,74
Livingstone	8	0,66
Montevideo	3	0,24
Choleraesuis	3	0,24
Bradney	3	0,24
0:1,3,19 (E4)	2	0,16
Kapemba	2	0,16
Umbilo	1	0,08
Thompson	1	0,08
Panama	1	0,08
Muenster	1	0,08
Mishmarhaemek	1	0,08
Kottbus	1	0,08
Infantis	1	0,08
Totale	231	18,78%

LNI, linfonodi ileocecali

Attraverso la sierotipizzazione dei ceppi isolati sono stati identificati 21 sierotipi di *Salmonella*, tra questi *S.* 4,[5],12:i:- è risultato il sierotipo maggiormente isolato (4,47%),

seguito dalla *S.* Rissen (3,25%) e *S.* Derby (2,68%) mentre *S.* Typhimurium ha presentato una prevalenza al macello soltanto dello 0,74%.

In termini di partite analizzate 38 partite su 41 (92,7%) campionate sono risultate positive per la presenza di almeno un sierotipo di *Salmonella*.

Antibiotico-resistenza e fenotipi di resistenza

Il test di sensibilità agli antibiotici è stato eseguito su 94 ceppi di *S.* 4,[5],12:i:- di cui 55 isolati da linfonodi prelevati al macello e 39 provenienti da campioni patologici. Il 90,42% degli isolati è risultato essere multiresistente (resistenza a 4 o più antibiotici). Il 48,94% dei ceppi è stato classificato come tetra-resistenti o ASSuT (resistenza nei confronti di Ampicillina-Streptomicina-Sulfametossazolo-Tetraciclina) ed il 41,49% è risultato essere penta-resistente o ACSSuT (resistenza nei confronti di Ampicillina-Cloramfenicolo-Streptomicina-Sulfametossazolo-Tetraciclina). Il tasso di resistenza ai singoli antibiotici testati è riportato in tabella 2.

Tabella 2. Antibiotico-resistenza dei ceppi di *Salmonella* 4,[5],12:i:- alle diverse classi di antibiotici.

Table 2. Antimicrobial resistance of stains of *Salmonella* 4,[5],12:i:- to different classes of antibiotics.

Antibiotico	Numero di isolati resistenti Tot=94	% degli isolati resistenti
Ampicillina	87	92,55%
Cloramfenicolo	40	42,55%
Streptomicina	94	100%
Sulfametossazolo	94	100%
Tetraciclina	85	90,43%
Gentamicina	55	58,51%
Florfenicolo	38	40,43%
Kanamicina	38	40,43%
Trimetoprim	28	29,79%
Acido nalidixico	35	37,23%
Colistina	19	20,21%
Cefotaxime	6	6,38%
Ceftazidime	11	11,70%
Ciprofloxacina	5	5,32%

I risultati delle minime concentrazioni inibenti ottenute dai 94 ceppi di *Salmonella* Typhimurium variante monofasica per i 14 antimicrobici testati sono riportati in tabella 3.

Tabella 3. Risultati di MIC per i 14 antimicrobici testati dei 94 ceppi di Salmonella Typhimurium variante monofasica.
Table 3. MICs for 14 antimicrobial agents of 94 Salmonella Typhimurium monophasic variant.

Antimicrobici	Distribuzione degli isolati (conta) nel range di diluizione del valore di MIC (µg/ml)																			
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		
Ampicillina							2	4	1											
Cloramfenicolo							1 (<2)	11	38	4				2	38 (>64)					
Streptomicina													1	3	90 (>128)					
Sulfametossazolo																			94 (>1024)	
Tetraciclina							1 (<0,5)	4	3	1			1	1	83 (>64)					
Gentamicina								1	19	19		7	15	33 (>32)						
Florfenicolo							1 (<2)	38	17			5	1	32 (>64)						
Kanamicina								2 (<4)	6	25	23				13	6	19 (>128)			
Trimetoprim							44 (<0,5)	5	3	1	2	2	2	24 (>32)						
Acido nalidixico															26 (<4)	21	12	18	10	7 (>64)
Colistina													74 (<2)	1	9	10 (>4)				
Cefotaxime							10 (<0,06)	1	35	27	14	1								
Ceftazidime																				
Ciprofloxacina																				

I campi in grigio indicano il range di diluizione di ogni antibiotico.

I *breakpoints* di resistenza per ogni antibiotico sono indicati dalla banda verticale nera.

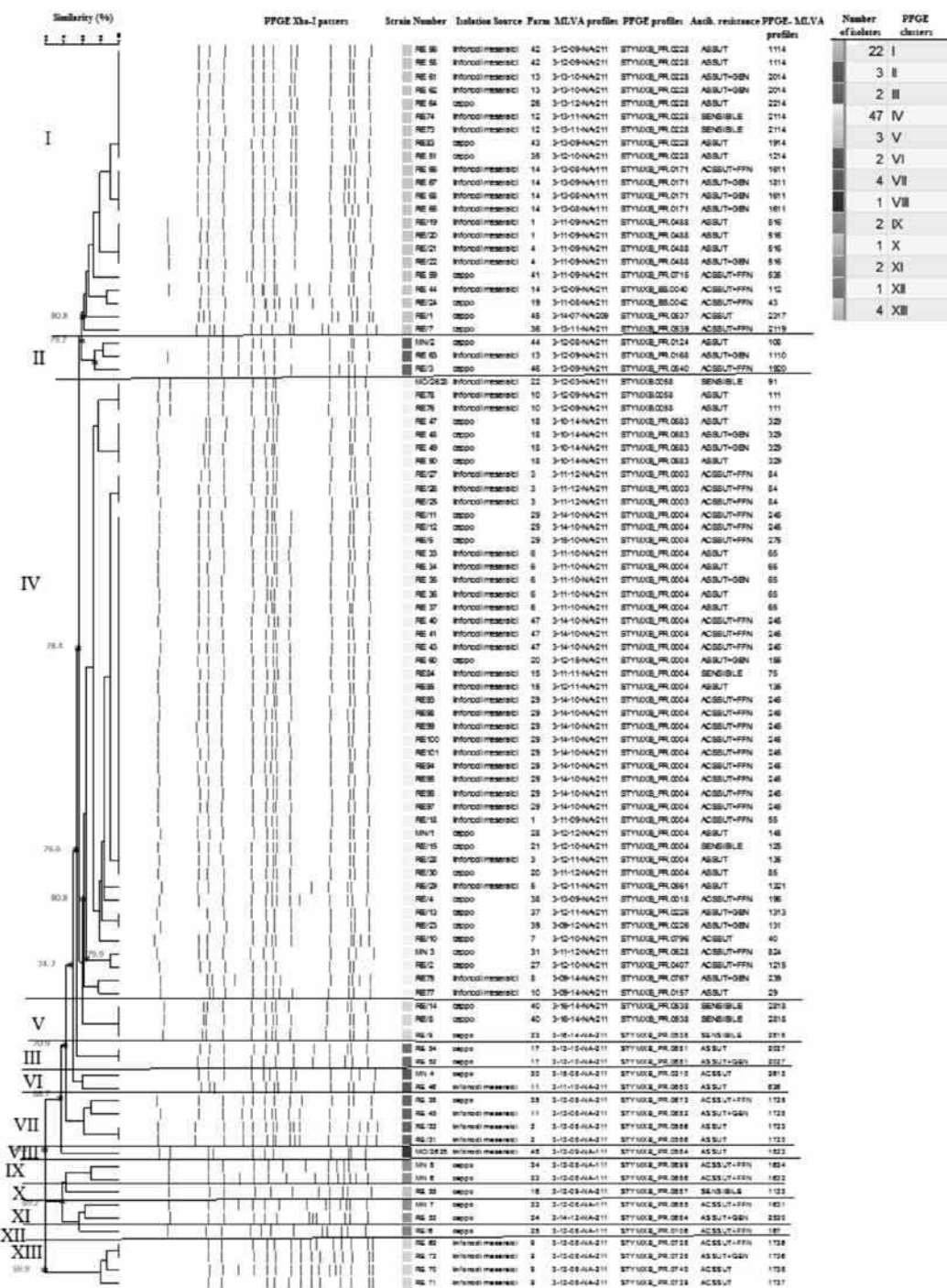
Resistenze aggiuntive alla gentamicina (19,15%) e al florfenicolo (36,17%) sono state osservate rispettivamente nei ceppi presentanti i fenotipi ASSuT e ACSSuT. La distribuzione delle classi di resistenza agli antimicrobici non differiva significativamente tra i ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* isolati rispettivamente al macello e da campioni provenienti dalla produzione primaria, ad eccezione della ciprofloxacina (0% di ceppi resistenti isolati al macello, Vs 12,2% isolati dalla produzione primaria, $p < 0.01$) e dell'acido nalidixico (22,6% di ceppi resistenti isolati al macello Vs 56,1% in produzione primaria, $p < 0.01$).

Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLVA di ceppi di *S. 4,[5],12:i:-*

Tra i 94 ceppi genotipizzati la PFGE ha individuato 40 differenti genotipi. STYMXB_PR.0004 è risultato il pulsotipo più frequentemente rilevato e in cui ricadono sia ceppi isolati al macello (21) sia ceppi isolati in campioni patologici (7). In 28 casi il pulsotipo rilevato è risultato presente soltanto in un ceppo, questo ha riguardato 19 ceppi di campo e 9 ceppi isolati al macello. La "cluster analysis" dei profili PFGE, effettuata utilizzando il coefficiente di similarità DICE metodo UPGMA, ha permesso di ottenere un dendrogramma (Figura 1) nel quale i ceppi sono stati raggruppati in 13 differenti clusters, indicati dall'I al XIII. I profili che mostravano una percentuale di similarità maggiore o uguale all'80% sono stati raggruppati nello stesso cluster. Nel cluster I e nel IV sono stati compresi rispettivamente 22 e 47 ceppi, pari al 73,4 % dei ceppi esaminati.

Figura 1. Dendrogramma di 94 *S. enterica* 4,[5],12:i:- basato sui profili PFGE. Sono evidenziati 13 cluster.

Figure 1. Dendrogram of 94 *S. enteric* 4,[5],12:i:- based on *Xba*-I PFGE profiles. Thirteen cluster (I-XIII) are marked.



Con la metodica MLVA sono stati individuati 28 differenti profili genetici, il genotipo più frequente (3-14-10-NA-211) è risultato presente in 2 ceppi isolati da materiale patologico ed in 12 ceppi isolati al macello. In 12 occasioni i ceppi tipizzati hanno mostrato un profilo genetico unico.

La maggior variabilità della metodica MLVA è stata riscontrata nei loci STTR5 e STTR6 con rispettivamente 8 e 9 alleli differenti e con un valore di Indice di Diversità di Simpson pari a 0,805 e 0,814 rispettivamente. Il locus STTR10pl, localizzato sul plasmide batterico *pSLT*, è risultato assente in tutti i ceppi analizzati, mentre al locus STTR9 è stato individuato un unico allele a 3 ripetizioni in tutti i ceppi.

Il calcolo dell'Indice di Diversità di Simpson tra le due metodiche è risultato pari a 0,898 e 0,926 per la PFGE e l'MLVA rispettivamente (Tabella 4), le due metodiche risultano significativamente differenti tra loro in termini di potere discriminante ($p < 0,05$). Combinando insieme i profili diversi ottenuti dalle due metodiche il potere discriminante aumenta in modo significativo (Indice di Diversità di Simpson 0,97 $p < 0,001$).

Tabella 4. Indice di diversità calcolati per la PFGE, l'MLVA e la combinazione PFGE-MLVA. **Table 4.** Indices of diversity calculated for PFGE, MLVA and the combination PFGE-MLVA.

Tecnica	Numero di profili	Indice di diversità di Simpson	IC (95%)	p-value *
PFGE	40	0,898	(0,846-0,951)	0,040
MLVA	28	0,946	(0,928-0,964)	
PFGE-MLVA	57	0,970	(0,950-0,990)	<0,001

* p-value calcolato secondo il metodo "Jackknife pseudo-values resampling"

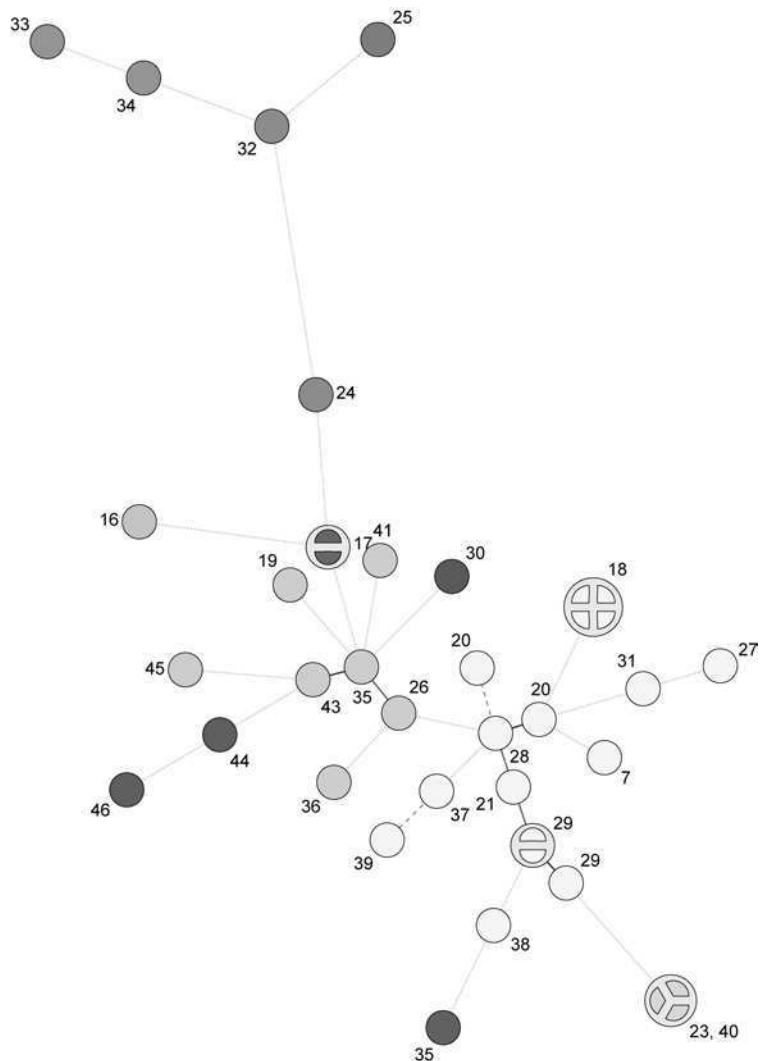
Utilizzando i dati di entrambi i metodi di tipizzazione le 94 salmonelle isolate mostrano 57 differenti genotipi (Figura 1). In un caso lo stesso ceppo (profilo PFGE_MLVA 245) è stato rilevato sia al macello che in materiale patologico, in tutti gli altri casi il ceppo è stato rilevato o soltanto al macello o soltanto in produzione primaria. Osservando soltanto i 39 ceppi isolati da materiale patologico, dai 30 allevamenti di provenienza, sono stati identificati 32 differenti genotipi di *Salmonella* monofasica. Quando più di una *Salmonella* monofasica è stata isolata dal medesimo allevamento, in 3 casi si è trattato del medesimo genotipo ed in altrettanti 3 casi gli isolati sono risultati differenti tra loro (Figura 2). In 24 casi si è isolato un solo genotipo di *Salmonella*.

Figura 2. MST generato dal Software BioNumerics basato sui profili combinati PFGE-MLVA di 39 ceppi *S. enterica* 4,[5],12:i:- isolati da suini.

E' stata creata una cluster analysis a partire da un "dataset composit" di PFGE-MLVA (Average from Experiment-UPGMA). Ogni nodo rappresenta un unico profilo combinato PFGE-MLVA, i nodi possono essere suddivisi in sezioni, il numero di sezioni è uguale al numero di ceppi con quel profilo. I colori dei nodi si riferiscono a differenti gruppi PFGE (vedi dendrogramma Figura 1). I numeri indicati in prossimità dei nodi corrispondono ai diversi allevamenti di provenienza dei suini.

Figure 2. MST generated by BioNumerics Software based on PFGE-MLVA combined allelic profiles of 39 *S. enterica* 4,[5],12:i:- isolated from pigs.

A cluster analysis based on Composit Dataset of PFGE-MLVA profiles was generated. Each node represents a unique PFGE-MLVA profile and can be divided in more than one section, the number of sections is equal to the number of strains with the same profile. The colors of the nodes indicate different PFGE clusters (see Figure 1).The numbers listed near the nodes correspond to the different farms of origin of pigs.



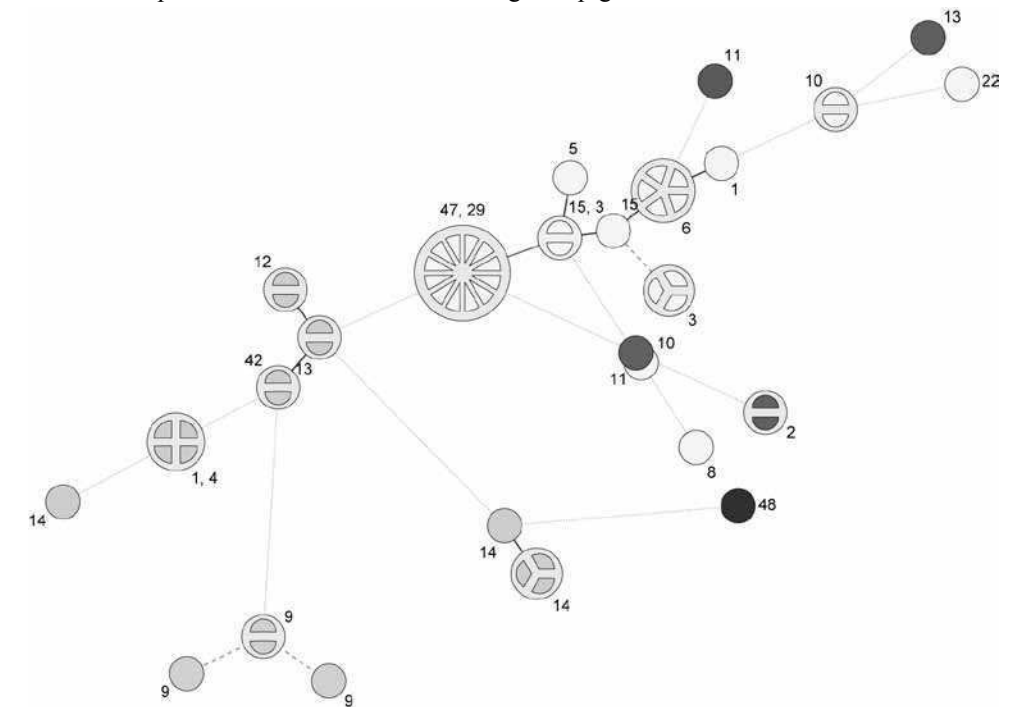
Analizzando i ceppi isolati dai linfonodi al macello questi provenivano da 19 allevamenti differenti. I ceppi mostravano complessivamente 26 diversi profili PFGE_MLVA (corrispondenti ai 26 nodi dell'MST di Figura 3). In linfonodi provenienti da 8 allevamenti, nella medesima partita di macellazione, più di un genotipo di variante monofasica è stata rilevata al macello (all.to: 1, 3, 9, 10, 11, 13, 14, 15), nei restanti 11 allevamenti soltanto un genotipo è stato ritrovato nella partita di macellazione (all.to: 2, 4, 5, 6, 8, 12, 22, 29, 42, 47, 48).

Figura 3. MST generato dal Software BioNumerics basato sui profili combinati PFGE-MLVA di 55 ceppi *S. enterica* 4,[5],12:i:- isolati dai suini al MACELLO.

E' stata creata una cluster analysis a partire da un "dataset composit" di PFGE-MLVA (Average from Experiment-UPGMA). Ogni nodo rappresenta un unico profilo PFGE-MLVA, i nodi possono essere suddivisi in sezioni, il numero di sezioni è uguale al numero di ceppi con quel profilo. I colori dei nodi si riferiscono a differenti gruppi PFGE (vedi dendrogramma Figura 1). I numeri indicati in prossimità dei nodi corrispondono ai diversi allevamenti di provenienza dei suini.

Figure 3. MST generated by BioNumerics Software based on PFGE-MLVA combined allelic profiles of 55 *S. enterica* 4,[5],12:i:- isolated from pigs at SLAUGHTERHOUSE.

A cluster analysis based on Composit Dataset of PFGE-MLVA profiles was generated. Each node represents a unique PFGE-MLVA profile and can be divided in more than one section, the number of sections is equal to the number of strains with the same profile. The colors of the nodes indicate different PFGE clusters (see Figure n. 1).The numbers listed near the nodes correspond to the different farms of origin of pigs.



Dal punto di vista delle resistenze agli antibiotici, nessun particolare genotipo risulta associato ai differenti profili fenotipici (ASSuT e ACSSuT).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente studio relativi alla prevalenza di *Salmonella* in linfonodi di suini regolarmente macellati (18,78%) appaiono in accordo con quanto riportato nei risultati di uno studio condotto dall'EFSA sulla prevalenza al macello in Italia (16,5%) (EFSA, 2008). Il dato ottenuto appare in linea con quanto osservato in altri Paesi come Francia (18,1%), Spagna (29%), Irlanda (16,1%) e nettamente superiore a quella riscontrata in stati con bassi livelli di prevalenza come Svezia (1,3%), Danimarca (7,7%) e Olanda (8,5%) (EFSA, 2008). I fattori di rischio che sono alla base di questa elevata prevalenza per l'allevamento italiano possono essere inquadrati nell'impiego di abbondanti quantità di alimento liquido e nella durata del periodo di ingrasso, maggiore in Italia rispetto a quello osservato negli altri Stati europei, con una durata di 3-4 mesi in più rispetto a quello richiesto per la produzione del suino leggero (Merialdi et al., 2008).

La prevalenza riscontrata per i singoli sierotipi indicano un significativo aumento della variante monofasica *S. 4,[5],12:i:-* mentre *S. Typhimurium* ha evidenziato nel nostro studio una prevalenza dello 0,74%, in diminuzione rispetto al dato riportato dall'EFSA nel 2008 dell'1,6%. L'elevata prevalenza della variante monofasica appare un dato di estremo interesse, confermando l'emergenza legata alla diffusione di questo sierotipo, raramente isolato fino alla metà degli anni '90 e diventato oggi tra i principali sierotipi, in termini di frequenza, isolati da casi di salmonellosi umana. Da notare da questo punto di vista, che uno dei ceppi di variante monofasica tipizzati in questo studio è risultato essere identico ad un ceppo isolato in un caso di salmonellosi umana avvenuto nel medesimo anno di campionamento (dati non mostrati).

La valutazione dei profili di antibiotico-resistenza ha messo in evidenza come il 48,9% dei ceppi di variante monofasica *S. 4,[5],12:i:-* testati nello studio presentasse un profilo di tetra-resistenza nei confronti di ampicillina, streptomina, sulfamidici e tetraciclina o ASSuT. Questo dato è in accordo con quanto evidenziato negli anni precedenti in Italia dove un nuovo fenotipo di resistenza ASSuT, è emerso tra i ceppi di *Salmonella Typhimurium* e della sua variante monofasica isolati in casi di salmonellosi nell'uomo (Dionisi et al., 2009). Il 41,5% dei ceppi *S. 4,[5],12:i:-* ha presentato un profilo di penta-resistenza o ACSSuT mostrando, rispetto ai ceppi presentati il profilo ASSuT, resistenza anche nei confronti del cloramfenicolo.

Tra i due gruppi di isolati (macello e allevamento) non sono state registrate differenze significative in termini di resistenza, eccetto per la ciprofloxacina e l'acido nalidixico, dove i ceppi di variante monofasica isolati dai suini al macello hanno evidenziato livelli di resistenza inferiori o assenti nei confronti di queste molecole se comparati con i ceppi isolati da campioni patologici. Tali differenze sono risultate statisticamente significative.

Le resistenze registrate nei confronti di ciprofloxacina (5,32%), cefotaxime (6,38%) e ceftazidime (11,70%), forniscono un dato che necessita un'attenta valutazione considerando che in altri Paesi, come ad esempio la Danimarca, nei ceppi di variante monofasica non si registrano resistenze nei confronti di fluorochinoloni e cefalosporine (Arguello et al., 2013), sottolineando la necessità di preservare l'efficacia di queste molecole per l'importanza che rivestono in medicina umana. La percentuale di resistenza osservata per il florfenicolo (40,43%) rappresenta sicuramente motivo di preoccupazione, considerando che questa molecola è relativamente di nuova introduzione, essendo registrata dal 2000 per la terapia antibiotica nel suino.

Al fine di studiare le relazioni genetiche esistenti tra i 94 ceppi di *S. 4,[5],12:i:-*, isolati da suini al macello e dall'attività diagnostica dell'IZSLER nell'anno 2013, sono state

applicate le metodiche di genotipizzazione PFGE ed MLVA ed è stato valutato il loro potere discriminante.

Nel presente studio i valori degli indici di Diversità di Simpson calcolati per la metodica MLVA e per la PFGE sono risultati alti ed è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra le due metodiche, risultando la metodica MLVA più discriminante della PFGE. Utilizzando i profili combinati delle due metodiche si ottiene un indice di diversità significativamente maggiore rispetto all'utilizzo delle metodiche singolarmente. Questo rimarca l'importanza di utilizzare più di un metodo di tipizzazione genetica per ricercare relazioni epidemiologiche tra i ceppi di *Salmonella* isolati, come evidenziato anche in una recente pubblicazione (Barco et al., 2014) che analizza due focolai di salmonellosi umana che hanno coinvolto la variante monofasica.

Relativamente ai 57 genotipi combinati PFGE-MLVA rilevati, 31 provenivano da campioni patologici e 25 da linfonodi isolati al macello, uno era comune a entrambe le categorie di origine. I campioni patologici provenivano da 30 differenti allevamenti, mentre i ceppi isolati da linfonodi al macello provenivano da 19 allevamenti. Quando è stata isolata più di una variante monofasica dal medesimo allevamento sia in sede di macellazione sia da campioni patologici, per circa la metà dei casi esse sono risultate appartenere al medesimo genotipo (7 casi su 15 al macello e 3 casi su 6 tra i ceppi isolati nella produzione primaria), nella restante parte dei casi più di un genotipo è stato rilevato. L'isolamento di ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* presentanti profili diversi da uno stesso allevamento può essere legata a due principali fattori. Il primo di questi è costituito dall'elevato numero di sorgenti d'infezione che si possono osservare a livello di produzione primaria (introduzione di animali da altri allevamenti o siti, l'alimento, l'acqua di bevanda, la circolazione di uccelli selvatici, di roditori o di altri animali) che possono veicolare diversi ceppi appartenenti allo stesso sierotipo o a sierotipi diversi. Il secondo fattore, già citato in precedenza, è legato alla tipologia produttiva, tipicamente italiana, del suino pesante che si caratterizza con la macellazione di animali di almeno 9 mesi d'età e che pertanto sono esposti al rischio d'infezione per periodi più lunghi rispetto ad altre tipologie produttive europee. A questo proposito si ribadisce come l'infezione da *Salmonella* spp. si osserva nelle prime fasi del periodo d'ingrasso (150 gg di vita), con un progressivo aumento della sieroprevalenza che raggiunge il livello massimo all'età di macellazione (Merialdi et al., 2008).

Come naturale conseguenza questi fattori influenzano anche la possibilità di isolare ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* con profili diversi al macello, sebbene in questa sede, altre cause possono determinare addirittura un aumento di questo fenomeno. Lo stress degli animali legato al trasporto verso l'impianto di macellazione, così come il digiuno forzato prima della macellazione, aumentano l'eliminazione di *Salmonella* da parte di animali portatori che possono così contaminare le strutture adibite al trasporto e i box delle stalle di sosta del macello (Carlson et al., 2012). A questo proposito è stato osservato come la prevalenza dell'infezione aumenti in proporzione all'attesa nei box delle stalle di sosta al macello prima della macellazione, considerando che è possibile l'isolamento del microrganismo dai linfonodi sottomandibolari due ore dopo l'infezione (Hurd et al., 2001).

Questo rimarca l'importanza di monitorare la presenza di *Salmonella* in differenti momenti dell'allevamento suino, dai riproduttori fino al finissaggio degli animali ed al macello, dove è possibile rilevare nella medesima partita salmonelle differenti da quelle osservate in allevamento (Magistrali et al., 2008).

In conclusione, i risultati del nostro studio confermano l'alta prevalenza di *Salmonella* spp. in suini regolarmente macellati e sottolineano l'elevata incidenza della variante monofasica *S. 4,[5],12:i:-* che si conferma come sierotipo emergente ed attualmente preponderante. I dati di

antibiotico-resistenza ottenuti dai ceppi di S. 4,[5],12:i:- da un lato confermano la circolazione di due principali profili fenotipici di multiresistenza (ASSuT ed ACSSuT) e dall'altro evidenziano fenomeni di resistenza antibiotica sia nei confronti di molecole d'interesse per la salute animale (florfenicolo e colistina) sia per la salute pubblica come fluorochinoloni e cefalosporine. L'impiego combinato di metodiche di genotipizzazione come PFGE e MLVA ha evidenziato un elevato potere discriminante confermando l'importanza del loro utilizzo in studi epidemiologici. I risultati ottenuti, quindi, sottolineano l'importanza di un continuo monitoraggio della prevalenza, della resistenza agli antibiotici e della variabilità genetica dei ceppi circolanti per una migliore comprensione dell'epidemiologia dell'infezione da *Salmonella* che possedendo tutti gli attributi per un'ampia diffusione (numerose serbatoi, efficiente eliminazione fecale, persistenza nell'ambiente ed efficace trasmissione attraverso vettori meccanici) risulta estremamente complessa e di conseguenza di difficile controllo.

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute, Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza Alimentare (PRC2011013). Si ringrazia la Sig.ra Anna Frulio per l'assistenza tecnica fornita nell'esecuzione della PFGE e il Dott. Luca Bolzoni per il supporto statistico nell'elaborazione dati derivati dall'analisi genetica.

BIBLIOGRAFIA

Alcaline S.D., Warnick L.D., Wiedmann M. (2007) "Antimicrobial resistance in non typhoidal *Salmonella*". *J. Food. Prot.* 70, 780-790.

Antunes P., Mourao J., Pestana N., Peixe L. (2011) "Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms". *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2028-2032.

Arguello H., Sorensen G., Carvajal A., Baggesen D.L., Rubio P., Pedersen K. (2013) "Prevalence, serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig production". *Res. Vet. Sci.* 95, 334-342.

Barco L., Ramon E., Cortini E., Longo A., Dalla Pozza M.C., Lettini A.A., Dionisi A.M., Olsen J.E., Ricci A. (2014) "Molecular characterization of *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- DT193 ASSuT Strains from two outbreaks in Italy". *Foodborne Pathog. Dis.* 11,138-144.

Carlson S., Barnhill A.E., Griffith R.W. (2012) "Salmonellosis" in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. "Diseases of swine" 10a ed., West Sussex, UK, Wiley-Blackwell, 821-833.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution susceptibility Tests for bacteria Isolated from Animals, approved standard, 3rd edn". CLSI, Wayne, Pennsylvania.

CSFM (2013) "Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué". Available at http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM_2013.pdf.

Dionisi A.M., Graziani C., Lucarelli C., Filetici E., Villa L., Owczarek S., Caprioli A., Luzzi I. (2009) "Molecular characterization of multidrug-resistant of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy". *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 711-717.

Edwards P.R. (1962) "Serologic examination of *Salmonella* cultures for epidemiologic purposes". *Public Health Service Publication. National Communicable Disease Center, Atlanta.*

European Food Safety Authority, (2008) "Report of the taskforce on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in EU, 2006-2007". *EFSA J.* 135, 1-111.

European Food Safety Authority, (2010) "Panel on biological hazards (BIOHAZ) scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs". *EFSA J.* 8 (4), 1547.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010". *EFSA J.* 10, 2597.

European Food Safety Authority, (2013) "The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011". *EFSA J.* 11 (5), 3196.

Grimont P.A.D., Weill F.X. (2007) "Antigenic formulae for the *Salmonella* serovars (9th ed.)". WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France. (<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>).

Graziani C., Busani L., Dionisi A.M., Lucarelli C., Owczarek S., Ricci A., Mancin M., Caprioli A., Luzzi I. (2008) "Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy". *Vet. Microbiol.* 128, 414-418.

Hauser E., Tietze E., Helmuth R., Junker E., Blank K., Prager R., Rabsch W., Appel B., Fruth A., Malorny B. (2010) "Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans". *App. Environ. Microb.* 76, 4601-4610.

Hopkins K.L., Kirchner M., Guerra B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczak A., Threlfall E.J., Mevius D.J. (2010) "Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, [5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill.* 15, 19580.

Hur J., Choi Y.Y., Park J.H., Jeon B.W., Lee H.S., Kim A.R., Lee J.H. (2011) "Antimicrobial resistance, virulence-associated genes and pulsed field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea". *Can. J. Vet. Res.* 75, 49-56.

Hurd H.S., Gailey J.K., McKean J.D., Rostagno M.H. (2001) "Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment". *Am. J. Vet. Res.* 62, 1194-1187.

International Organization for Standardization. (2007) "ISO 6579:2002/ Amd 1:2007. Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage, amendment 1, annex D". In *Microbiology of food and animal feedings stuffs. Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Larsson J.T., Torpdahl M., Peterson R.F., Sorensen G., Lindstedt B.A., Nielsen E.M. (2009) "Development of a new nomenclature for *Salmonella typhimurium* multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)". *Euro Surveill.* 14(15) pii, 19174.

Lindstedt B.A., Vardund T., Aas L., Kapperud G. (2004) "Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* using PCR multiplex and multicolor capillary electrophoresis". *J. Microbiol. Methods* 59, 163-172.

Magistrali C., Dionisi A.M., De Curtis P., Cucco L., Vischi O., Scuota S., Zicavo A., Pezzotti G. (2008) Contamination of *Salmonella* spp. In a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse". *Res. Vet. Sci.* 85, 204-207.

Mainar-Jaime R.C., Andrés S., Vico J.P., Garrido V., Grilló M.J. (2012) "Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Standard Method for detection of *Salmonella* spp. on Mesenteric Lymph Nodes from Slaughter pigs". *J. Clin. Microbiol.* 51, 89-94.

Meakins S., Fisher I.S., Berghold C., Gerner-Smidt P., Tschäpe H., Cormican M., Luzzi I., Schneider F., Wannett W., Coia J., Echeita A., Threlfall E.J. (2008) "Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network". *Microb. Drug Resist.* 14, 31-35.

Merialdi G., Barigazzi G., Bonilauri P., Tittarelli C., Bonci M., D'Incau M., Dottori M. (2008) "Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds". *Zoonoses Public Health* 55, 222-226.

Morris G.K., Steele C.D., Wells J.G. (1972) "Evaluation of plastic multi-well plates for serological screening of *Salmonella* cultures with Spicer-Edwards pooled antisera". *Appl. Microbiol.* 24, 846-848.

Pires S.M., de Knecht L., Hald T. (2011) "Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/technical report". European Food Safety Authority, Parma, Italy.

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. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L. 325/1 del 12.12.2003.

Spicer C.C. (1956) "A quick method of identifying *Salmonella* H antigens". *J. Clin. Pathol.* 9, 378-379.

EFFICACIA DI UN VACCINO ATTENUATO E DI UNO INATTIVATO PER LA PROFILASSI DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO

EFFICACY OF AN ATTENUATED AND KILLED (INACTIVATED) *SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRAINS AGAINST *SALMONELLOSIS* IN GROWING PIGS

RUGGERI J.¹, PESCIAROLI M.^{2,3}, MARTINELLI N.¹, GRADASSI M.¹, SCAGLIONE F.E.⁴, AMMENDOLA S.⁵, BATTISTONI A.⁵, MAGISTRALI C.F.⁶, PASQUALI P.², ALBORALI G.L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 25124 Brescia, Italy;

²Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; FAO Reference Center for Veterinary Public Health.

³VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense Madrid. 28040 Madrid. Spain.

⁴Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Torino, 10095 Torino, Italy;

⁵Department of Biology, Università di Roma Tor Vergata, 00133 Rome, Italy;

⁶Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, 06126 Perugia, Italy.

Parole chiave: Vaccino mucosale, *Salmonella*, Suino, Sicurezza, Immunogenicità.

Keywords: Mucosal vaccine, *Salmonella*, Pig, Safety, Immunogenicity.

RIASSUNTO

La contaminazione della carne di suino da *Salmonella* spp. è una delle cause d'infezioni enteriche dell'uomo e la vaccinazione dei suini può ridurre la contaminazione lungo la catena produttiva. Recentemente abbiamo dimostrato che *S.Typhimurium* deleta del trasportatore ZnuABC (*S.Typhimurium* ΔznuABC) è un vaccino attenuato promettente in alcuni modelli murini d'infezione da *S.Typhimurium* (Ammendola, 2007; Pasquali, 2008; Pesciaroli, 2011). In questo studio, abbiamo confermato la sicurezza e l'efficacia di *S.Typhimurium* ΔznuABC somministrato per via orale nei suini. La sicurezza di *S.Typhimurium* ΔznuABC è stata testata monitorando le condizioni cliniche degli animali ed eseguendo analisi microbiologiche e sierologiche della risposta immunitaria umorale e cellulare nei campioni di feci e di sangue. Abbiamo testato l'efficacia di *S.Typhimurium* ΔznuABC in 2 gruppi di suini vaccinati con 2 diversi dosaggi del ceppo, paragonando i risultati con quelli ottenuti da un gruppo di suini vaccinati con un ceppo inattivato e da un gruppo non vaccinato. Dopo l'infezione con il ceppo omologo virulento, i suini vaccinati con *S.Typhimurium* ΔznuABC non presentavano segni clinici e la colonizzazione del tratto intestinale e l'eliminazione fecale del ceppo virulento di *S.Typhimurium* era ridotta rispetto ai controlli.

Questi risultati suggeriscono che *S.Typhimurium* ΔznuABC è attenuato e immunogeno nei suini e potrebbe essere un promettente vaccino mucosale attenuato.

ABSTRACT

Pork meat contamination by *Salmonella* spp. is a major cause of human enteric infections in industrialized countries and vaccination of pigs may represent an effective instrument in reducing *Salmonella* burden through the food chain. We have previously demonstrated that

S. Typhimurium lacking the ZnuABC transporter (*S. Typhimurium* Δ znuABC) is a promising candidate live vaccine in different mouse models of *S. Typhimurium* infection (Ammendola, 2007; Pasquali, 2008; Pesciaroli, 2011). In this study, we confirmed in pigs the safety and immunogenicity of *S. Typhimurium* Δ znuABC orally administered. We have tested the safety of *S. Typhimurium* Δ znuABC monitoring clinical conditions of animals and we conducted a microbiological culture and a quantification of the humoral and cellular immune response, respectively, on fecal and blood samples of pigs. We have tested the protective effects of *S. Typhimurium* Δ znuABC in four groups of pigs: animals vaccinated with *S. Typhimurium* Δ znuABC (two dosages tested), controls vaccinated with a formalin-inactivated virulent strain and unvaccinated controls. After the challenge, pigs vaccinated with the attenuated *S. Typhimurium* Δ znuABC strain did not display clinical signs of salmonellosis. The vaccine reduced intestinal tract colonization and fecal shedding of the fully virulent *Salmonella* strain. These results suggest that *S. Typhimurium* Δ znuABC is attenuated and immunogenic in pigs and it could be a promising attenuated live mucosal vaccine.

INTRODUZIONE

Salmonella spp. è un batterio responsabile di infezioni zoonotiche. L'emergenza dovuta all'antibiotico-resistenza ha ridotto gli approcci terapeutici, aumentando la percentuale di malattia nell'uomo. La salmonellosi è un problema anche per gli allevatori per la riduzione dell'indice di produzione o l'aumento della percentuale di morti (Selke, 2007; Hur, 2010; Pasquali, 2008).

A tutela della salute umana, la Comunità Europea ha emanato dei regolamenti per l'individuazione e il controllo di alcune serovar di *Salmonella* lungo tutta la filiera alimentare.

Le strategie per ridurre la prevalenza prevedono: programmi di controllo sierologico, misure di biosicurezza, metafilassi con mangimi medicati, probiotici ed acidi organici e controllo degli animali infestanti. La vaccinazione sembrerebbe rappresentare la prima soluzione per ridurre l'eliminazione fecale e la contaminazione ambientale nei paesi con alta percentuale d'isolamento di *Salmonella* –spp. al macello (Boyen, 2008; Hur, 2011). Un vaccino attenuato, sicuro ed efficace per i suini non è ancora presente in commercio (Pasquali, 2008).

Il nostro lavoro ha l'obiettivo di produrre un vaccino sicuro, efficace e facilmente somministrabile, che associato alle buone pratiche manageriali consentirà di ridurre la percentuale d'isolamento di *Salmonella* –spp. al macello (Rostagno, 2011; Leymann, 2011; Beloeil, 2007).

MATERIALI E METODI

Ceppi Batterici

In questo studio è stato utilizzato un ceppo mutante di *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, caratterizzato dalla delezione dell'operone *znuABC*, ottenuta attraverso la ricombinazione omologa di un frammento di PCR, inserendo la cassetta di resistenza all'antibiotico nel gene target.

Sierologia

I sieri prelevati da ogni animale sono stati sottoposti ad indagine sierologica mediante un kit ELISA indiretto (Herd-Check Swine Salmonella Antibody Test Kit, Idexx Laboratories Inc., Switzerland).

Il sangue prelevato con l'anticoagulante è stato sottoposto alla prova dell'IFN- γ , titolando la citochina con un'ELISA sandwich (Porcine IFN- γ Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, MN, USA).

Microbiologia

Le analisi microbiologiche, condotte in accordo alla procedura ISO 6579:2002, hanno lo scopo di determinare il titolo nei campioni in esame di *Salmonella* spp. Le feci e gli organi sono stati pesati e addizionati di nove parti di Acqua Peptonata Tamponata (BPW) (Oxoid Ltd, UK), omogenati in stomacher e diluiti in diluizioni scalari. Tutte le diluizioni sono state incubate a 37°C per 18 \pm 3 ore e, 0.1 ml delle diluizioni, sono state seminate in piastre di MSRV (semisolid modified Rappaport-Vassiliadis agar, Oxoid Ltd, UK) e incubate a 41.5°C per 24/48 ore.

Le piastre di MRSV positive sono trapiantate in due terreni selettivi differenziali che sono Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (Oxoid Ltd, UK) e Brillant Green Agar (Oxoid Ltd, UK) e incubate a 37° C per 18 \pm 3 ore. Le colonie sospette sono trapiantate per infissione in TSI agar (Reparto Produzione Terreni, Izslar, Brescia), e incubate a 37° C per 18 \pm 3 ore. La crescita viene sottoposta a identificazione biochimica in micrometodo con BBL Enterotube II (BD Franklin Lakes, NJ USA).

Dopo l'identificazione biochimica, i campioni positivi sono inviati al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, il quale definisce il sierotipo coinvolto mediante tipizzazione sierologica.

Inoltre, le colonie sospette sono state sottoposte all'identificazione in PCR per distinguere il ceppo virulento da *S. Typhimurium* Δ znuABC.

I tamponi ambientali, prelevati dal box di ogni gruppo, sono sottoposti solo ad analisi qualitative, indicanti la sola presenza o assenza del microrganismo.

Disegno sperimentale

Ventisei suini magroni, acquistati presso un allevamento *Salmonella*-SPF, sono stati alloggiati presso le stalle d'isolamento dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

I suini sono stati divisi in quattro gruppi. I gruppi A (6 suini) e B (6 suini) sono stati vaccinati per via orale mediante una sonda gastrica con, rispettivamente, 5x10⁸ e 5x10⁷ UFC di *S. Typhimurium* Δ znuABC, sciolta in 20 ml di una soluzione di sodio bicarbonato al 10 %, per favorire una migliore sopravvivenza del microrganismo. Il gruppo C è stato vaccinato per via intramuscolare con 2 ml di *S. Typhimurium* inattivata, alla dose di 10⁹ UFC. Il gruppo D (8 suini) è il gruppo controllo.

Ai giorni 1, 2, 7, 14 e 21, dopo la vaccinazione, sono stati eseguiti i prelievi di sangue, feci e tamponi ambientali ed è stata misurata la temperatura. Dopo trentacinque giorni, gli animali sono stati pesati ed inoculati con il ceppo virulento. Il challenge è stato eseguito per via orale con 4x10⁸ UFC di *S. Typhimurium* virulenta mediante sonda gastrica. Ogni settimana, fino all'abbattimento, sono stati prelevati il sangue, le feci, i tamponi ambientali e la temperatura dei soggetti. Tre settimane dopo il challenge, i suini sono stati sottoposti ad eutanasia e le tonsille, il fegato, il rene, la milza, la cistifellea, i linfonodi cieco-colici, il polmone, il duodeno, il digiuno prossimale e distale, l'ileo, il cieco e il colon sono stati prelevati per l'esame microbiologico.

RISULTATI

Sicurezza di *S. Typhimurium* Δ znuABC

Un leggero rialzo febbrile è stato registrato in alcuni animali dei gruppi vaccinati con *S. Typhimurium* Δ znuABC, fino al secondo giorno post-vaccinazione (Fig.1). Non ci sono differenze statisticamente significative nel ritmo di crescita tra soggetti vaccinati e i controlli (Fig.2).

Fig.1 Lieve aumento della temperatura media del gruppo A e del gruppo B dopo la vaccinazione con *S. Typhimurium* ΔznuABC. È rappresentata la temperatura media di ogni gruppo e la deviazione standard ai differenti time-points.

Fig.1 Group A and B display rise of body temperature after vaccination with *S. Typhimurium* ΔznuABC. Mean values and SD bars of body temperature of each group at different time-points

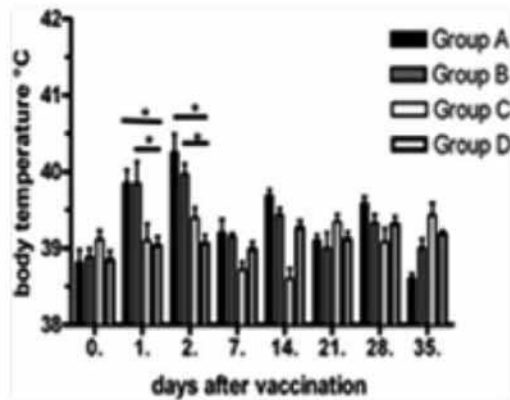
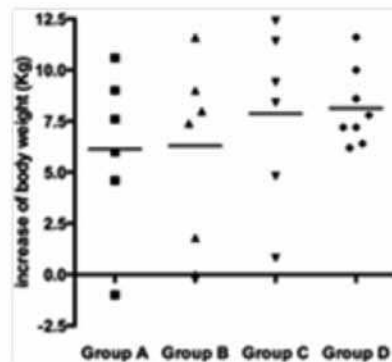


Fig.2 Incremento di peso degli animali dei differenti gruppi a seguito della vaccinazione. Ogni simbolo rappresenta un animale e la barra il valore medio di gruppo

Fig.2 Weight gain of animals of different groups. Each symbol represents one animal and bars represent mean value of the group.



La concentrazione di *S. Typhimurium* ΔznuABC nelle feci decresce e dopo 28 giorni non è stata isolata dai gruppi trattati (Fig.3). Nei tamponi ambientali il ceppo è stato isolato fino al settimo giorno post- vaccinazione.

Negli animali vaccinati la produzione di anticorpi aumenta dal settimo giorno post-vaccinazione (Fig.4) e non ci sono differenze statisticamente significative della titolazione dell'IFN-γ.

Fig. 3 Eliminazione fecale di *S. Typhimurium* ΔznuABC dal gruppo A e dal gruppo B dopo la somministrazione orale di, rispettivamente 5×10^8 e 5×10^7 CFU/suino. È riportato il valore medio di CFU/g di ogni gruppo e la deviazione standard ai diversi time-points.

Fig.3 Fecal shedding of *S. Typhimurium* ΔznuABC by groups A and B after oral administration with 5×10^8 e 5×10^7 CFU/pig, respectively. Mean values with SD bars of CFU/g of each group at different time points.

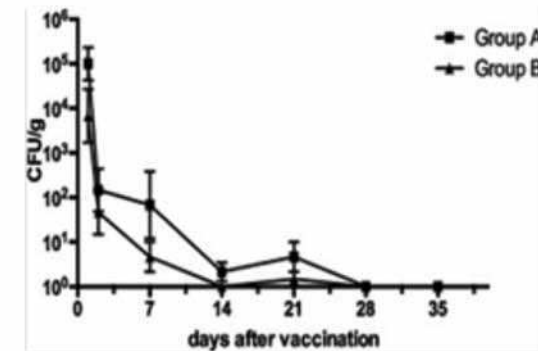
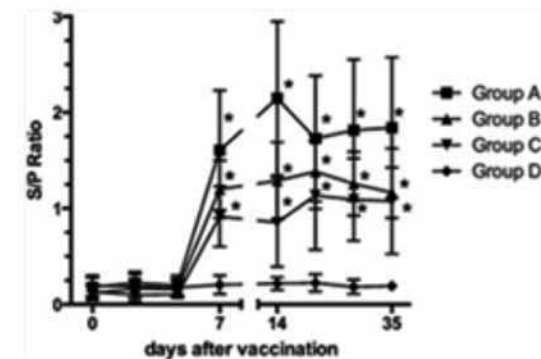


Fig. 4 *S. Typhimurium* ΔznuABC e *S. Typhimurium* ATCC14028 inattivato inducono una risposta immunitaria umorale simile. Dopo la vaccinazione il siero dei suini è stato prelevato in diversi momenti (1, 7, 14, 21, 28, 35 giorni post-vaccinazione). È rappresentato il valore medio del titolo anticorpale di ogni gruppo associato alla deviazione standard (barra) ai diversi time-points. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa tra i gruppi A, B e C ed il gruppo D. $P \leq 0,05$

Fig. 4 *S. Typhimurium* ΔznuABC and inactivated *S. Typhimurium* ATCC14028 induce a similar pattern of humoral immune response. After vaccination, serum of pigs was collected at several time-points; Mean values with SD bars of antibodies titers of each group at different time points. Groups with asterisk are statistically different from group D at the time point considered * P -value $\leq 0,05$



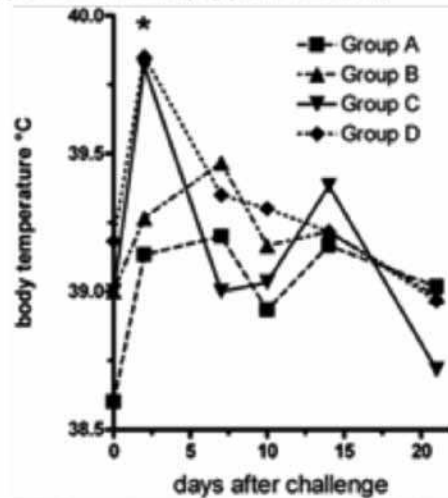
Efficacia di *S. Typhimurium* ΔznuABC

Gli animali vaccinati del gruppo A e B non hanno evidenziato segni clinici a seguito dell'infezione con il ceppo virulento, diversamente gli animali del gruppo C e D hanno evidenziato prostrazione, anoressia e incremento transitorio della temperatura corporea.

A 2 giorni dal challenge i soggetti dei gruppi C e D avevano una temperatura corporea media superiore rispetto ai gruppi A e B (Fig.5).

Fig. 5 Temperatura corporea media di gruppo ai diversi time point dopo il challenge con *S.Typhimurium* ATCC 14028. A due giorni dal challenge c'è una differenza statisticamente significativa di temperatura media di gruppo tra il gruppo A (vaccinati con il ceppo attenuato) e il gruppo D (non vaccinato).

Fig. 5 Body temperature at different time points after a challenge infection with virulent *S.Typhimurium*. The differences between groups A and D were statistically significant (P -value $\leq 0,05$)



L'incremento medio di peso è di 7.7 Kg per il gruppo A, 6.1 Kg per il gruppo B, 5.9 Kg per il gruppo C e 3.3 Kg per il gruppo D.

L'incremento di produzione dell'IFN- γ nel gruppo B inizia dal secondo giorno post-challenge. Tutti i gruppi vaccinati producono l'IFN- γ a 7 giorni dal challenge, mentre il gruppo D raggiunge un picco di produzione d'IFN- γ dopo tre settimane (Fig.6).

Fig. 6 Incremento della produzione di IFN- γ nei gruppi in esame ai time point successivi al challenge. Incremento rapido nel gruppo A a due giorni dal challenge. Nel gruppo D inizia il settimo giorno post-infezione con un picco massimo alla terza settimana.

Fig. 6 Production of IFN- γ in groups after challenge, starting two days after infection in group A and seven days after infection in group D.

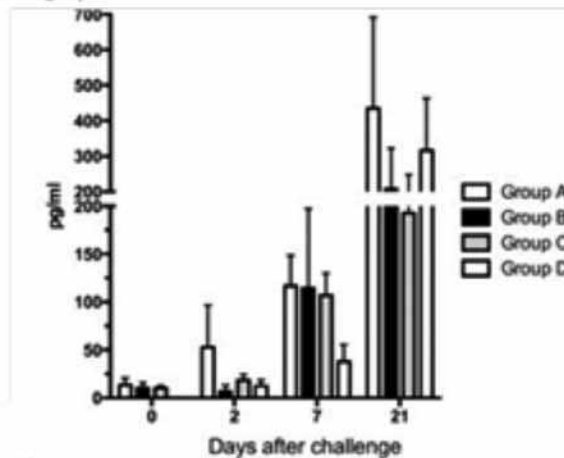
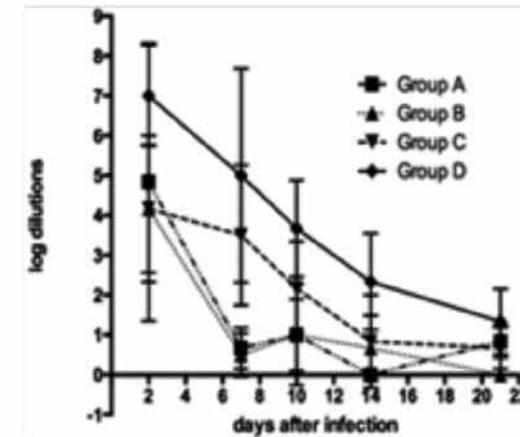


Fig. 7 Eliminazione fecale del ceppo virulento di *S.Typhimurium* nei giorni successivi all'infezione nei quattro gruppi. I simboli rappresentano la concentrazione media di eliminazione di *S.Typhimurium* per ogni gruppo ai diversi prelievi, le barre rappresentano la deviazione standard.

Fig. 7 *S.Typhimurium* fecal shedding at different time points after challenge infection. Symbols represent group means, bars represent standard deviation.



La consistenza delle feci è stata punteggiata mediante una scala arbitraria (0 feci normali, 5 feci acquose). Esiste una differenza statisticamente significativa tra il gruppo D ed i gruppi A e B a due giorni dall'infezione.

L'eliminazione fecale di *S.Typhimurium* nei gruppi vaccinati (A, B e C) è minore rispetto ai soggetti infetti del gruppo D, a due giorni dal challenge. Dalla prima settimana post-infezione, i gruppi A e B hanno evidenziato una radicale diminuzione della concentrazione di *S.Typhimurium* nelle feci (Fig.7).

All'abbattimento i soggetti vaccinati con il ceppo inattivato hanno una maggiore colonizzazione a carico degli organi linfatici e una minore colonizzazione degli organi intestinali rispetto al gruppo D. Mentre *S. Typhimurium* colonizza gli organi degli animali dei gruppi A e B a concentrazioni inferiori rispetto ai gruppi C e D.

DISCUSSIONE

La salmonellosi negli allevamenti suini è un danno economico a carico degli allevatori ed è un pericolo per la salute dei consumatori.

Negli allevamenti con alto indice di prevalenza, la vaccinazione, associata alle buone pratiche manageriali, è lo strumento più valido nel controllo dell'infezione.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di allestire un vaccino vivo attenuato di *S.Typhimurium*, delecto del gene che codifica per un trasportatore dello zinco ($\Delta znuABC$) e di valutarne la sicurezza e l'efficacia nei suini in condizioni sperimentali.

S.Typhimurium $\Delta znuABC$, a questi dosaggi, non è patogeno se somministrato ai suini in accrescimento. Non ha rallentato l'accrescimento degli animali e l'ecotossicità è limitata ai primi 14 giorni.

S.Typhimurium $\Delta znuABC$ è immunogeno poiché determina la produzione di IgA, altamente protettive nei confronti dei microrganismi enteropatogeni (Hur et al., 2010, 2011) e stimola la risposta immunitaria cellulo-mediata caratterizzata da una rapida e cospicua produzione

d'IFN- γ nei gruppi vaccinati con il ceppo attenuato a seguito del challenge. *S. Typhimurium* $\Delta znuABC$ è efficace, pochi animali dei gruppi A e B, rispetto ai gruppi C e D, hanno manifestato diarrea e febbre dopo l'infezione con il ceppo virulento. La clearance di *S. Typhimurium* è più rapida nei soggetti vaccinati del gruppo A e B e la concentrazione di colonizzazione degli organi di questi suini è minore rispetto agli altri gruppi. È presumibile sostenere che la vaccinazione con *S. Typhimurium* $\Delta znuABC$ protegge dalla malattia e riduce il numero di portatori nell'allevamento.

BIBLIOGRAFIA:

1. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Rotilio G, Battistoni A. (2007) "High affinity Zn²⁺ uptake system *ZnuABC* is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to virulence of *Salmonella enterica*". *Infect Immun* 75, 5867-5876.
2. Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Fablet C, Madec F, Alioum A. (2007) "Risk factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow-to-finish herds". *Vet Res* 38, 835-848.
3. Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. (2009) "Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control". *Veterinary Microbiology* 130, 1-19.
4. Hur J, Lee JH. (2010) "Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis". *Vet Microbiol* 143, 270-276.
5. Hur J, Song SO., Lim JS., Chung IK., Lee JH. (2011) "Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella Typhimurium* vaccine for protection against *Salmonella* infections in growing piglets". *Vet Immunol Immunopathol* 139, 250-256.
6. Leyman B., Boyen F., Van Parys A., Verbrugge E., Haesebrouck F., Pasmans F. (2011) "Salmonella *Typhimurium* LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs". *Vaccine* 29, 3679-3685.
7. Pasquali P, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, Valente C, et al. (2008) "Attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* lacking the *ZnuABC* transporter confers immune-based protection against challenge infections in mice". *Vaccine* 26, 3421-3426.
8. Pesciaroli M, Aloisio F, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, et al. (2011) "An attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strain lacking the *ZnuABC* transporter induces protection in a mouse intestinal model of *Salmonella* infection". *Vaccine* 29, 1783-1790.
9. Rostagno M. (2011) "Vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in pigs". *Veterinary Record* 169, 551-552.
10. Selke M, Meens J, Springer S, Frank R, Gerlach GF. (2007) "Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* live negative-marker vaccine". *Infect Immun* 75, 2476-83.

EPIDEMIOLOGIA INTERSPECIFICA DI MRSA NELL'AMBITO SUINICOLO

INTERSPECIFIC EPIDEMIOLOGY OF MRSA IN PIG FARMING

DE FAVERI E.⁽¹⁾, RIMOLDI S.⁽²⁾, PAGANI C.⁽²⁾, SALA V.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica – Università di Milano;
⁽²⁾ Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "L. Sacco" – Università di Milano

Parole chiave: MRSA, epidemiologia, suino, medico veterinario.

Key words. MRSA, epidemiology, pig, veterinarian.

Riassunto. Le popolazioni di MRSA sono classificate in rapporto all'origine, distinguendo *S. aureus* Healthcare-Acquired (HA), Community-Acquired (CA) e Livestock-Acquired (LA); per questi ultimi gli animali produttori di alimenti destinati all'uomo hanno un ruolo epidemiologico importante. Questo ha generato il sospetto che la zootecnia intensiva possa essere, per la frequenza e l'intensità d'impiego dei trattamenti antibatterici, un ambito elettivo della selezione clonale delle antibiotico-resistenze. La presenza di LA-MRSA nella produzione suinicola è oggi una certezza in molti Paesi e il suino è considerato un serbatoio di trasmissione verso l'uomo e gli altri animali domestici; infatti, gli allevatori e gli addetti alla produzione hanno un tasso di colonizzazione molto maggiore, rispetto al resto della popolazione. In questo lavoro è stata segnalata la presenza di MRSA nei suini da macello (2,3% di positività nelle amigdale), nelle scrofe (10% di positività nei tamponi nasali) e nei veterinari occupati in suinicoltura (25% di portatori nasali). Molti degli isolamenti dai suini e dall'uomo appartengono ai medesimi pattern genomici.

Summary. The populations of MRSA are classified in relation to their origin, distinguishing *S. aureus* Healthcare-Acquired aureus (HA), Community-Acquired (CA) and Livestock-Acquired (LA). For LA-MRSA livestock animals have an important epidemiological role. This has raised the suspicion that the intensive husbandry may be, for the frequency and intensity of use of antibacterial treatments, an elective field of clonal selection of antibiotic resistance. The presence of LA-MRSA in pig production is sure in many countries and the pig is considered a reservoir for transmission to humans and other animals. In fact, farmers and production workers have a higher rate of colonization than the rest of the population. This work reports the presence of MRSA in slaughter pigs (2.3 % positivity of the tonsils), sows (10 % positivity of nasal swabs) and veterinarians employed in pig production (25% of nasal carriers). Many of the isolates from pigs and man belong to the same genomic patterns.

INTRODUZIONE

I primi cloni resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati segnalati poco l'introduzione della meticillina nella pratica clinica, ma fino al 1980 la loro rilevanza è stata marginale (Brumfitt & Hamilton-Miller, 1989); solo in seguito, gli stafilococchi aurei meticillino-resistenti (MRSA) sono stati inseriti tra i principali agenti d'infezioni ospedaliere nel mondo. Oggi, negli Stati Uniti e in Europa fino al 30-50% degli stafilococchi aurei responsabili d'infezioni ospedaliere sono meticillino-resistenti (EARSS, 2008; NNIS, 2002) mentre nei Paesi Bassi e in Scandinavia i tassi di resistenza sono inferiori al 3%, grazie a piani di controllo e prevenzione correttamente gestiti.

In seguito, le popolazioni di MRSA sono state classificate in rapporto all'ambito di origine e/o di maggiore circolazione, distinguendo quindi *S. aureus* Healthcare-Acquired (HA), Community-Acquired (CA) e Livestock-Acquired (LA); sono questi ultimi che vedono coinvolti, con un ruolo epidemiologicamente decisivo, gli animali produttori di alimenti destinati all'uomo e che hanno generato l'ipotesi che la zootecnia intensiva possa essere, per la frequenza e l'intensità d'impiego dei trattamenti antibatterici, un ambito elettivo della selezione clonale delle antibiotico-resistenze. A parziale conferma di questa indicazione, un rapporto olandese ha mostrato un tasso di colonizzazione molto maggiore negli allevatori e negli addetti alla produzione, rispetto al resto della popolazione (Voss *et al.* 2005); altre successive indagini hanno confermato questa indicazione nella stessa Olanda (de Neeling *et al.*, 2007; Huijsdens *et al.*, 2006; van Duijkeren *et al.*, 2008) in Belgio (Denis *et al.*, 2009) in Canada (Khanna *et al.*, 2007) in Germania (Witte *et al.*, 2007) e negli Stati Uniti (Smith *et al.*, 2008b).

La presenza di LA-MRSA nella produzione suinicola è oggi una certezza in molti Paesi e il suino è ormai considerato un potenziale serbatoio di trasmissione verso l'uomo e gli altri animali domestici; le sue più probabili funzioni epidemiologiche sarebbero la selezione delle varianti LA resistenti o addirittura la conservazione e la diffusione di quelle CA provenienti dall'uomo (Cui *et al.*, 2009; Wagenaar *et al.*, 2009).

Il contatto con i maiali è dunque ritenuto un fattore di rischio rilevante per la colonizzazione dell'uomo (Lewis *et al.*, 2008; Van Rijen *et al.*, 2008) al punto da assumere rilevanza socio-sanitaria in alcuni Paesi: in Olanda, la diffusione dei patotipi più frequenti nell'ambito zootecnico, in pratica nulla nel 2002, ha raggiunto il 21% nel 2006 (van Duijkeren *et al.*, 2008). Il fenomeno è certamente associato al contatto continuo con gli animali, poiché la colonizzazione riguarda particolarmente i veterinari, gli allevatori e i loro familiari.

Ciononostante, i fattori di rischio in suinicoltura sono stati indagati solo marginalmente: la continuità del lavoro a contatto con i suini è il principale, ma la qualità sanitaria del management può essere un fattore di amplificazione o riduzione.

Le indagini sulla localizzazione di MRSA nei veterinari hanno evidenziato una prevalenza relativamente elevata, sempre superiore a quella della popolazione generale; la mappatura dei cloni batterici ha confermato l'ipotesi dell'esposizione professionale in ippiatria e nell'ispezione degli alimenti di origine animale (Anderson *et al.*, 2008; Christianson *et al.*, 2007) mentre non esistono indicazioni certe nei veterinari occupati in suinicoltura.

Ciò ha motivato l'indagine di cui riportiamo i primi risultati in questa nota; il lavoro ha interessato i suini (scrofe in allevamento e maiali al macello) e un gruppo di veterinari che frequentano professionalmente gli allevamenti e i macelli industriali del settore.

Per una maggiore comprensione epidemiologica, sono stati mappati gli isolamenti, per verificare la presenza dello stesso genotipo nel suino e nell'uomo e quindi una circolazione interspecifica favorita dal sistema di produzione.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 28 Medici Veterinari, la cui attività professionale si svolge esclusivamente nel comparto suinicolo; il campione ha compreso Veterinari Aziendali, professionisti operanti per conto di Companies commerciali del settore suinicolo e Veterinari del Servizio Veterinario delle Aziende Sanitarie Locali operanti presso gli stabilimenti di macellazione. Il prelievo è avvenuto, previo consenso informato, mediante tampone nasale monolaterale.

Le procedure di campionamento sono state eseguite in osservanza dell'articolo 13 del Decreto Legislativo n° 106 del 30 giugno 2006 (Codice in materia di protezione dei dati personali); ogni individuo ha sottoscritto due moduli, fornendo il proprio consenso informato

alla procedura e al trattamento dei dati personali. Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Milano.

Il campionamento sui suini è stato invece condotto in tre differenti stabilimenti di macellazione dell'Italia settentrionale; sono state esaminate in totale dieci partite di suini pesanti da macello, provenienti da allevamenti del Piemonte e della Lombardia. Il prelievo delle tonsille palatine è stato eseguito in catena di sezionamento; sono state prelevate e inserite in un contenitore sterile monouso individuale 486 tonsille, provenienti dal 50% dei 974 suini delle partite di macellazione considerate. Tutti i campioni dello stesso lotto di macellazione sono stati mantenuti uniti.

In due allevamenti a ciclo chiuso completo, rispettivamente situati nelle provincie di Cremona e Pordenone, sono stati eseguiti tamponi nasali a 30 scrofe in sala parto, per ciascuno di essi. Tutti i tamponi nasali sono stati eseguiti mediante tampone sterile monouso con terreno di trasporto tipo Ames W/OCH (Oxoid Italia); la manovra è stata eseguita in modo asettico e non traumatico, evitando qualsiasi contatto contaminante. I tamponi sono stati immediatamente refrigerati (4-8°C) e in queste condizioni recapitati entro le 24 ore successive al laboratorio d'analisi.

I prelievi di origine animale sono stati recapitati al laboratorio di Patologia Suina del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica dell'Università di Milano, mentre i campioni di provenienza umana sono stati consegnati al Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'Azienda Ospedaliera e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano.

Il protocollo batteriologico-diagnostico è stato il medesimo, indipendentemente dalla provenienza e dall'origine dei campioni.

Tamponi nasali

- Semina diretta in piastra su terreno MSA2 Gélose Chapman2 (Biomerieux, Francia) e su terreno selettivo Oxacillin-Salt Screen Agar (Biolife Italiana).
- Incubazione a 37°C per 18-24 ore.
- Lettura e interpretazione. MSA2: gli stafilococchi coagulasi-positivi (*S. aureus*) producono colonie con alone giallo, mentre i coagulasi-negativi hanno colonie bianche e non comportano viraggio del terreno Oxacillin-Salt Screen Agar: i ceppi di stafilococchi che crescono su questo terreno sono da considerare oxacillino-resistenti (la resistenza è estensibile alla meticillina e alla nafcillina). La valutazione crociata di crescita sui due terreni permette di individuare lo *S. aureus* meticillino resistente (MRSA)
- I ceppi isolati sono stati congelati a -20°C in glicerolo per una settimana e successivamente replicati su Tryptic Soy Agar (Biomerieux, Francia) prima dell'indagine biomolecolare.

Tonsille (da suini al macello)

- Omogeneizzazione mediante Stomacher (PBI Italia) previa preparazione 1:10 (P/V) in soluzione fisiologica.
- Semina, identificazione e preparazione per identificazione biomolecolare analoga a quella applicata ai tamponi nasali.

Biologia molecolare

I ceppi meticillino-resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati analizzati mediante rep-PCR (DiversiLab System - Biomerieux, Francia) presso il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'A.O e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano; attraverso questa tecnica è possibile collocare gli isolamenti simili in pattern genotipici differenti tra loro.

La sua applicazione prevede tre passaggi successivi: l'estrazione del DNA batterico (tramite UltraClean® Microbial DNA Isolation kit - Biomerieux, Francia), la sua amplificazione mediante rep-PCR e il rilevamento dei DNA fingerprinting mediante elettroferogramma. Attraverso un software dedicato (DiversiLab - Biomerieux, Francia) si procede quindi alla comparazione dei fingerprint dei diversi campioni e alla loro catalogazione nei pattern.

RISULTATI

Batteriologia

I risultati disponibili sono stati organizzati in Tabella 1; essi riguardano gli isolamenti dai tamponi nasali delle scrofe e dalle amigdale prelevate in macello, oltre a quelli dai tamponi nasali eseguiti sui medici veterinari professionalmente coinvolti nella filiera suinicola.

Soggetto prelevato	Prelievo	N. Campioni	Positivi	Negativi	% Positività
Medici Veterinari	T. nasale	28	7	21	25
Scrofe in azienda	T. nasale	60	6	54	10
Maiali da macello	Amigdale	486	11	475	2,3

Tabella 1. Categorie, materiali diagnostici e campioni positivi.

Table 1. Categories, diagnostic materials and positive samples.

Biologia molecolare

I risultati ottenuti mediante Diversilab sono riportati in Figura 1 e organizzati in Tabella 2; per maggiore chiarezza, ricordiamo qui che il sistema utilizzato permette di verificare il livello di similitudine del disegno genomico degli isolamenti, esprimendo una serie di "pattern" all'interno dei quali si collocano ceppi tra loro affini.

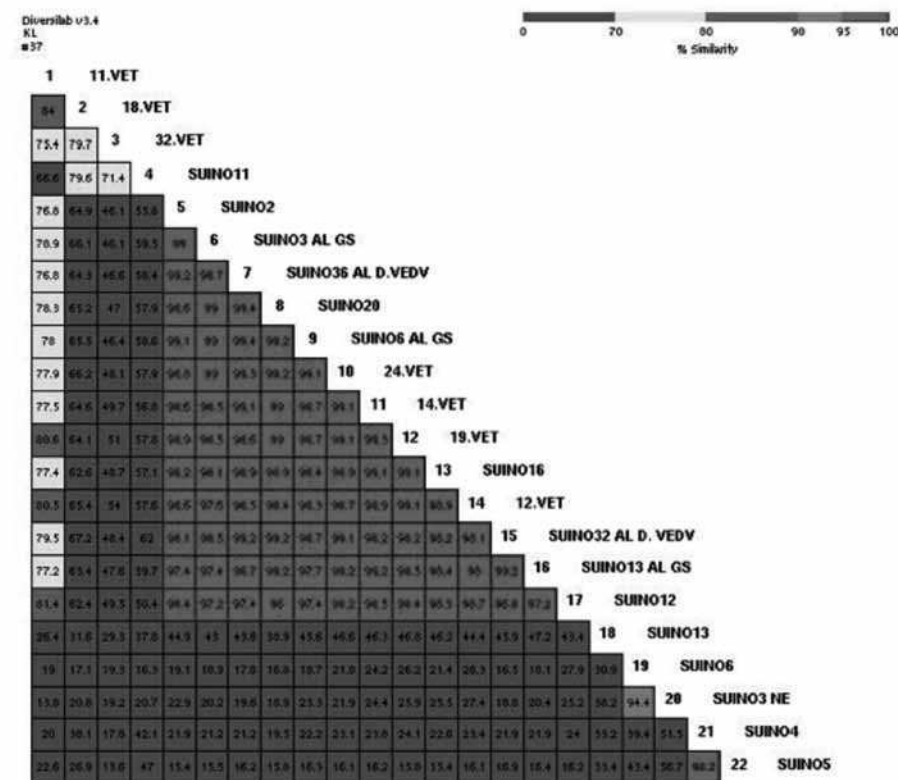


Figura 1. Similitudine genomica tra gli isolamenti da uomo e suino.

Figure 1. Genomic similarity among isolates from humans and pigs.

Sono stati sottoposti a rep-PCR 22 stipiti di MRSA: 7 sono stati isolati da veterinari e 15 da suini; l'analisi mediante Diversilab li ha collocati in 8 pattern, all'interno dei quali si sono distribuiti come indicato in Tabella 2.

Pattern	N. isolamenti	Provenienza
1	1	Veterinario
2	1	Veterinario
3	1	Veterinario
4	1	Suino
5	13	4 Veterinario, 9 Suino
6	1	Suino
7	2	Suino
8	2	Suino

Tabella 2. Suddivisione degli isolamenti nei pattern genomici.

Table 2. Breakdown of isolates among the genomic patterns.

È evidente come il pattern 5 sia quello numericamente più consistente, comprendendo ben 13 isolamenti; inoltre, è anche l'unico nel quale sono rappresentati MRSA provenienti sia dal suino, sia dell'uomo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ben 13 isolamenti sui 22 sottoposti ad analisi genomica si sono collocati nel pattern numero 5, che comprende ceppi derivati sia dai maiali da macello e dalle scrofe, sia da 4 medici veterinari; questi ultimi, portatori di MRSA a livello nasale, sono in tre casi responsabili diretti del management di grossi insediamenti suinicoli intensivi della pianura padana (localizzati a Brescia, Mantova e Modena) mentre il quarto è impiegato a tempo pieno in una macello industriale di suini. Il denominatore comune del loro stato di portatori è la frequentazione continua di ambiti diversi della filiera produttiva, che presuppongono comunque un contatto continuativo con i suini.

Le coppie di isolamenti dal suino collocate nei pattern 7 e 8, provengono da allevamenti territorialmente distanti e differenti per indirizzo produttivo; anche questa indicazione è molto interessante e potrebbe presupporre l'esistenza di un meccanismo di selezione dei cloni batterici, legato più a caratteristiche generali della gestione suinicola che a situazioni esclusive di ogni allevamento.

Nel pattern 5 questa indicazione si rafforza e amplifica per la presenza contemporanea degli isolamenti dai veterinari, che suggerisce la possibilità che la selezione di MRSA genomicamente simili anche in territori anche distanti tra loro, sia in grado di espandersi fino a coinvolgere anche le categorie umane a esposizione occupazionale.

Quanto fin qui disponibile in termini di risultati consente di confermare l'ipotesi che ha motivato questo progetto di ricerca, vale a dire l'esistenza di un percorso epidemiologico delle antibiotico-resistenze, lungo il quale la selezione avviene in ambito animale e l'esposizione professionale dell'uomo legata specificatamente a fattori di rischio non solo ambientali, può rappresentare la via d'accesso alla circolazione interumana.

Per altre conferme, sarà indispensabile includere altre categorie a rischio, come allevatori, loro familiari e dipendenti, valutando il tempo di contatto, la sua continuità e la ciclicità, ma anche considerando tempi e modalità di sopravvivenza di *S. aureus* negli ambienti di lavoro; ugualmente importante sarebbe valutare il rischio del personale addetto alle preparazioni mangimistiche, considerando tempi e frequenza di contatto con le premiscelate antibiotiche.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson M.E., Lefebvre S.L., Weese J.S. (2008). Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Vet. Microbiol.* 129:410-417.
- Brumfitt W., Hamilton-Miller J. (1989). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 320:1188-96.
- Christianson S., Golding G., Campbell J., Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Mulvey M. (2007). Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 45:1904-1911.
- Cui S., Li J., Hu C., Jin S., Li F., Guo Y., Ran L., Ma Y. (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:680-683.

- de Neeling A., van den Broek M., Spalburg E., van Santen-Verheuevel M., Dam-Deisz W., Boshuizen H., van de Giessen A., van Duijkeren E., Huijsdens X. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122:366-372.
- Denis O., Suetens C., Hallin M., Catry B., Ramboer I., Dispas M., Willems G., Gordts B., Butaye P., Struelens M.J. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infect. Dis.* 15:1098-1101.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (2008). Annual Report. Bilthoven, Netherlands: EARSS; 2009.
- Huijsdens X., van Dijke B., Spalburg E., van Santen-Verheuevel M., Heck M., Pluister G., Voss A., Wannet W., de Neeling A. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:26.
- Khanna T., Friendship R., Dewey C., Weese J.S. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.* 128:298-303.
- Lewis H.C., Mølbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau M., Sørum M., Skov R.L. (2008). Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cc398 infections in humans, Denmark. *Emerging Infect. Dis.* 14:1383-1389.
- NNIS (2002). National Nosocomial Infections Surveillance Report. Data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am J Infect Control* 2002;30:458-75.
- Smith T.C., Male M.J., Harper A.L., Moritz-Korolev E., Kroeger J.S., Diekema D.J., Herwaldt L.A. (2008). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in the midwestern United States. *International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta.*
- van Duijkeren E., Moleman M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M., Mullem J., Troelstra A., Fluit A.C., van van Loo I., Huijsdens X.W., Tiemersma E., de Neeling A.J., van de Sande-Bruinsma N., Beaujean D., Voss A., Kluytmans J. (2007a). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin. *Emerging Infect. Dis.* 13:1834-1839.
- van Rijen M.M., Bosch T., Heck M.E., Kluytmans J.A. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and transmission in a Dutch hospital. *J. Hosp. Infect.* 72:299-306.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infect. Dis.* 11:1965-1966.
- Wagenaar J.A., Yue H., Pritchard J., Broekhuizen-Stins M., Huijsdens X., Mevius D.J., Bosch T., van Duijkeren E. (2009). Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet. Microbiol.* 139:405-409.
- Witte W., Strommenger B., Stanek C., Cuny C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, central Europe. *Emerging Infect. Dis.* 13:255-258.

**ANALISI COMPARATIVA DI PARAMETRI IMMUNOLOGICI
SIERICI, MUCOSALI E CELLULO-MEDIATI DOPO INFEZIONE
DI CAMPO DA VIRUS PRRS (PRRSV)**

***COMPARATIVE EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE
TO A FIELD PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE
SYNDROME VIRUS (PRRSV) INFECTION IN TERMS OF SERUM
AND MUCOSAL ANTIBODY, AND CELL-MEDIATED IMMUNITY***

BILATO D.¹, DRIGO M.², PASOTTO D.², AMADORI M.¹

¹*Laboratorio di Immunologia cellulare,*

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

²*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS),*

Università degli Studi di Padova.

Parole chiave: immunità, PRRSV, siero, liquidi orali

Key words: immunology, PRRSV, serum, oral fluids

Riassunto

Scopo di questo lavoro è stato confrontare lo sviluppo temporale dell'immunità umorale e cellulo-mediata in 2 gruppi di scrofette PRRS-free introdotte in un allevamento da riproduzione infetto da PRRSV. In particolare, sono stati analizzati anticorpi IgG sierici, IgG ed IgA salivari, risposta cellulo-mediata (test di rilascio di interferon-gamma specifico per PRRSV). Tali parametri sono stati valutati al fine di evidenziare possibili differenze nello sviluppo e nella cinetica della risposta immunitaria nei confronti del virus della PRRS. Le scrofette hanno contratto l'infezione attorno alle 7-9 settimane dall'ingresso in allevamento. Sono emersi in particolare 4 risultati salienti: A) la precocità della risposta Ab nei liquidi orali di gruppo è analoga a quella evidenziata nei sieri; B) buone condizioni di sanità, benessere e conduzione aziendale si associano ad una precoce risposta immunitaria umorale e, soprattutto cellulo-mediata (test IFN-gamma), a differenza di quello che si osserva in allevamenti "problema" per PRRS; C) la risposta cellulo-mediata presenta differenze anche elevate tra soggetti dello stesso gruppo, ma i gruppi tendono a distinguersi chiaramente tra loro rispetto a tale parametro; D) la positività anticorpale nel liquido orale di gruppo viene assicurata anche solo da pochi suini sieropositivi sul totale degli 8-10 soggetti che depositano i liquidi orali. Sono state osservate infine alcune criticità riguardo all'uso del cordino di gruppo per il recupero dei liquidi orali in suini di età > 12 settimane, da affrontare con opportune modifiche del protocollo d'impiego.

Abstract

The aim of this work was to compare the time-course of humoral and cell-mediated immunity in 2 groups of PRRS - free gilts introduced into a PRRSV-infected breeding herd. In particular, we investigated serum IgG antibody, PRRSV-specific IgA and IgG in oral fluids and the cell-mediated response (PRRSV-specific release of interferon-gamma). These parameters were measured in order to identify possible discrepancies in the development and kinetics of the immune response against PRRS virus. Gilts got

regularly infected by PRRSV around 7-9 weeks after entering the farm. 4 results must be highlighted: A) the precocity of the Ab response in oral fluids group was similar to that seen in sera; B) good conditions of animal health, welfare and farm management were associated with an early humoral immune response and cell-mediated immunity, as well (gamma-IFN test), in contrast to what is observed in PRRS “problem” herds; C) the cell-mediated response may be considerably different among subjects of the same group, but each group tends to clearly distinguish itself with respect to this parameter; D) Ab-positive oral fluid samples can derive from a minority of seropositive pigs out of the 8-10 individuals that deposit the oral fluids. Lastly, some problems were reported regarding the use of the cotton rope for collecting oral fluids of pigs aged > 12 weeks. These problems should be dealt with by proper modifications of the applied protocol.

INTRODUZIONE

Nell’ambito delle numerose ricerche volte all’approfondimento delle conoscenze nei riguardi del virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS), uno dei temi principali è rappresentato dalla risposta immunitaria, da monitorare nell’ambito dei piani correnti di controllo della malattia a livello aziendale. A tale proposito, sono stati recentemente proposti nuovi approcci alla valutazione della risposta immunitaria in campo, tra cui la valutazione degli anticorpi mucosali e la ricerca del virus della PRRS anche nel fluido orale degli animali, nonché un saggio di immunità cellulo-mediata di facile utilizzo ed interpretazione (test di rilascio dell’IFN-gamma su sangue intero, Dotti et al., 2011). In particolare, va sottolineato che l’esecuzione dei test anticorpali su liquidi orali può facilitare notevolmente l’esecuzione dei controlli sanitari per PRRS, riducendo drasticamente i costi e l’impegno logistico ed organizzativo connesso ai prelievi di sangue. Il saggio dell’IFN-gamma ha invece la potenzialità di indicare un compiuto stato di immunizzazione verso PRRSV delle scrofe e delle scrofette nell’ambito dei consueti piani di condizionamento e/o di vaccinazione (Dotti et al., 2013). Pertanto, scopo di questo lavoro è stato valutare la risposta immunitaria di scrofette *PRRS-free* esposte in campo a PRRSV in un’azienda da riproduzione infetta. In particolar modo, è stato analizzato lo sviluppo della risposta immunitaria sierica e di quella mucosale rispetto alle possibili differenze dal punto di vista della precocità, dell’intensità e della durata.

MATERIALI E METODI

Azienda: Lo studio è stato condotto in un’azienda suinicola a ciclo aperto del Veneto il cui target commerciale è la vendita di magroni tra i 30 e i 35 kg di peso vivo. L’effettivo delle scrofe presenti in produzione è di 350-400 animali massimo.

L’allevamento risulta positivo per l’infezione da PRRSV da anni e viene effettuata una vaccinazione della rimonta prima con vaccino vivo attorno ai 140 giorni e quindi richiamato con vaccino spento dopo 3 settimane. La circolazione virale si attesta ad un livello di ipoendemia e dal punto di vista clinico può essere dichiarata una azienda stabile. Altre vaccinazioni che vengono effettuate in allevamento sono quelle contro Malattia di Aujeszky, Influenza, Rinite Atrofica e Parvovirus.

La rimonta è esterna, di circa 40-42 scrofette ogni due mesi, provenienti da un nucleo PRRSV-free introdotte all’età di circa 4 settimane.

Le scrofette al loro arrivo vengono messe in capannine interne all’azienda e qui mantenute per almeno 6-7 settimane senza particolari azioni di acclimatemento.

Disegno dello studio: Otto scrofette da rimonta, di 2 gruppi consecutivi, sono state marcate, raggruppate assieme e quindi seguite longitudinalmente ai seguenti tempi:

T1=giorno 1 (giorno seguente all’arrivo in azienda), T2=giorno 49 (uscita dalle capannine), T3=giorno 63, T4=giorno 77, T5=giorno 91 e T6=giorno 105. A ogni prelievo è stato prelevato il sangue senza anticoagulante per ottenere il siero e raccolto il liquido orale di gruppo mediante cordino. Ai tempi T2 e T6 è stata prelevata anche una seconda aliquota di sangue con eparina da utilizzare nelle prove di immunità cellulo-mediata.

Prelievo dei liquidi orali: dopo i prelievi sui singoli animali veniva posizionato un cordino di filo di cotone, sfilacciato all’estremità posta a circa 5 cm di altezza dal grugno degli animali per la raccolta dei liquidi orali. La durata dell’esposizione variava da un’ora per le scrofette campionate a T1 fino ai 20 minuti per quelle campionate a T6 in modo da assicurare un tempo necessario all’imbibizione del cordino senza comprometterne l’integrità. Appena ritirato, il cordino veniva posto in un sacchetto da stomacher, e trasportato in laboratorio a temperatura di refrigerazione.

Processazione dei campioni: i campioni di sangue senza anticoagulante sono stati sierati mediante centrifugazione a 1800 rpm per 10 minuti; il cordino è stato spremuto manualmente e il liquido raccolto centrifugato a 1800 rpm per 10 minuti a 5°C, quindi veniva recuperato il surnatante in provette e congelato a -20 °C in attesa delle analisi.

Analisi di laboratorio: le indagini hanno previsto di valutare la viremia e gli anticorpi specifici sul siero di sangue (rispettivamente, mediante real time RT-PCR, Belfanti et al., 2012, e kit *Herdcheck IDEXX PRRS X3 Antibody Test Kit*, seguendo le istruzioni del produttore), la risposta cellulo-mediata sul sangue intero in eparina (test IFN-gamma, Dotti et al., 2011), nonché la risposta in anticorpi mucosali IgA e IgG nei liquidi orali (LO) di gruppo. Il test gamma-IFN è stato eseguito su campioni di sangue intero previo contatto del medesimo con PRRSV, PBS e criolisato di MARC-145 per 20 ore a 37°C e 5% di CO₂. I campioni erano considerati positivi se l’OD in ELISA per IFN-gamma corrispondente al sangue intero stimolato con il virus della PRRS era maggiore rispetto a quello non stimolato (PBS) e a quello considerato come stimolo aspecifico (MARC-145), con un valore di riferimento positivo di 50 mOD di differenza. La lettura della piastra si eseguiva con spettrofotometro ad una lunghezza d’onda di 492 nm. I liquidi orali degli animali sono stati analizzati per valutare la presenza di anticorpi IgA e IgG anti-PRRSV tramite metodica ELISA. È stato adottato il kit IDEXX sopra menzionato. La procedura è stata adattata ai liquidi orali modificando radicalmente i fattori di diluizione dei reagenti, introducendo coniugati anti-isotipo Ig specifici e variando i tempi di incubazione previsti. I due saggi (rispettivamente per IgA e IgG) sono stati inseriti in altrettanti metodi di prova nel Sistema Qualità di IZSLER. RNA è stato estratto da 200 microlitri di siero di sangue o liquidi orali mediante procedura automatica su strumento QIACube della Qiagen.

RISULTATI

Lo stato clinico delle scrofette è rimasto soddisfacente durante il corso dell’intera sperimentazione. Lo stesso vale per i parametri produttivi e riproduttivi dell’allevamento nell’anno in cui è stata eseguita la prova di campo (n. aborti, portata al parto, n. suinetti svezzati / scrofa / anno). Le scrofette in esame sono risultate infette da PRRSV a distanza di 7 e 9 settimane dall’ingresso in allevamento, rispettivamente nei gruppi 1 e 2 (Tabella 1). La cinetica di sviluppo degli anticorpi sierici è risultata in accordo con quella degli anticorpi nei liquidi orali. Il test IFN-g (immunità cellulo-mediata) ha fornito risultati in accordo con i test anticorpali iniziali (Tabella 1). Non è stata invece rilevata alcuna positività al saggio in real-time RT-PCR né nei sieri dei singoli animali né nei liquidi orali di gruppo.

Tabella 1. Risposta Anticorpale (siero e liquido orali) e cellulo-mediata a virus PRRS.
Table 1. Antibody Response (serum and oral fluid) and PRRSV-specific cell-mediated response.

A) Gruppo 1

	Prelievo 1 (g0)	Prelievo 2 (g49)	Prelievo 3 (g63)	Prelievo 4 (g77)	Prelievo 5 (g91)	Prelievo 6 (g105)
Sieri: media s/p	0	0,35	NE	0,92	0,76	0,86
Positivi / totale	0/8	3/8	NE	8/8	7/8	8/8
LO: s/p test IgA	0 (NEG)	0,61 (POS)	NE	0,49 (DUB)	0,87 (POS)	0,75 (POS)
LO: s/p test IgG	0,10 (NEG)	1,83 (POS)	NE	1,04 (POS)	1,16 (POS)	1,06 (POS)
Test IFN-γ Pos + Dub / totale	NE	4/8	NE	NE	NE	0/8

B) Gruppo 2

	Prelievo 1 (g0)	Prelievo 2 (g49)	Prelievo 3 (g63)	Prelievo 4 (g77)	Prelievo 5 (g91)	Prelievo 6 (g105)
Sieri: media s/p	0,01	0,08	0,93	1,11	1,03	NE
Positivi / totale	0/8	1/8 *	8/8	8/8	8/8	NE
LO: s/p test IgA	0,02 (NEG)	0,21 (NEG)	0,91 (POS)	0,53 (DUB)	0,49 (DUB)	NE
LO: s/p test IgG	0,12 (NEG)	0,23 (NEG)	0,84 (POS)	1,09 (POS)	0,86 (POS)	NE
Test IFN-γ Pos + Dub / totale	NE	0/8	NE	NE	NE	NE

LO: liquidi orali. NEG: negativo. POS: positivo. DUB: dubbio. *1 solo campione con s/p 0,4 (valore soglia).
 NE: non eseguito.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Tale ricerca è risultata particolarmente utile al fine della validazione di metodiche ELISA atte a valutare la presenza di Ab specifici contro il virus della PRRS e per un confronto nello sviluppo della risposta umorale e cellulo-mediata.

Il controllo sanitario per la PRRS basato sul prelievo dei liquidi orali si è dimostrato accurato e tempestivo a fronte di un impegno logistico e organizzativo molto ridotto rispetto ai prelievi di sangue sul singolo animale. Inoltre, la rilevazione della risposta anticorpale nei liquidi orali si è dimostrata assai più “robusta” rispetto alla dimostrazione del virus nel siero e nei liquidi orali stessi mediante PCR.

Le condizioni di allevamento stabile per PRRS si è associata ad una dinamica favorevole della risposta immunitaria degli animali con sostanziale accordo tra i parametri anticorpali sierici, mucosali e di risposta cellulo-mediata. In riferimento a tale condizione epidemiologica, ciò suggerisce che il test IFN-g possa essere di utile completamento per il controllo sanitario verso la PRRS del parco scrofe e scrofette. Sulla base dei risultati conseguiti, il monitoraggio sarà esteso ad altri gruppi di scrofette in entrata al fine di confermare ed estendere le indicazioni ricavate dalla prova.

La raccolta dei fluidi orali mediante cordino di gruppo va opportunamente modulata in funzione dell'età degli animali (ovvero della loro mole) sia nei tempi che nelle modalità di esposizione, per assicurare il contatto efficace di tutti gli animali del gruppo e minimizzare gli effetti di competizione spaziale che possono portare ad atteggiamenti di aggressività per la conquista della corda, con possibili rotture e perdite del campione prima del ritiro.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Belfanti I., Mondin A., Drigo M., De Mateo Aznar M., Bortoletto G., Nardelli S., Ceglie L. (2012). Diagnostica virologica di PRRS: studio comparativo tra metodiche biomolecolari classiche ed innovative con campioni ottenuti da un'infezione sperimentale.. In: XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., 143-145, Sorrento (NA) PRRS, PCR, validazione metodi, 24-26 Ottobre 2012.
- 2) Dotti, S., Villa, R., Sossi, E., Guadagnini, G., Salvini, F., Ferrari, M., Amadori, M., 2011. Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naive pigs. Res. Vet. Sci. 90, 218-225.
- 3) Dotti, S., Guadagnini, G., Salvini, F., Razzuoli, E., Ferrari, M., Alborali, G.L., Amadori, M., 2013. Time-course of antibody and cell-mediated immune responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus under field conditions. Res. Vet. Sci. 94(3):510-7.

**CONFRONTO TRA DIFFERENTI MATRICI BIOLOGICHE
PER LA DIAGNOSI DI PRRS
DURANTE UN FOCOLAIO IN SUINI ALL'INGRASSO**

***COMPARISON OF DIFFERENT BIOLOGICAL SAMPLES
FOR THE DIAGNOSIS OF PRRS
DURING AN OUTBREAK IN FATTENING PIGS***

MARRO S.¹, GORIA M.², VITALE N.², MICELI I.², MONNIER M.², ZOPPI S.²,
DONDO A.², FACCENDA M.³

¹ Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Università di Torino;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta di Torino;

³ Medico Veterinario libero-professionista, Busca (CN)

Parole chiave: PRRSV, tampone bronchiale, tampone nasale, fluidi orali, lavaggio bronco-alveolare, PCR

Key words: PRRSV, oral fluids, bronchoalveolar lavage, bronchial swab, nasal swab, PCR

Riassunto

Uno dei passaggi più critici per il controllo della PRRS nell'allevamento suino è rappresentato dalla identificazione affidabile del virus negli animali di nuova introduzione, come le scrofette da rimonta.

In questo lavoro, al fine di identificare tutti gli animali portatori/eliminanti di PRRSV, è stata eseguita la ricerca del virus attraverso RT-nested PCR a partire da differenti matrici biologiche, quali siero, tampone nasale, tampone bronchiale, liquido di lavaggio bronco-alveolare e fluidi orali.

Scopo principale del presente studio è stato confrontare diverse matrici biologiche prelevate in suini in fase di magronaggio-ingrasso in un focolaio di PRRS al fine di valutare quale di esse consenta di rilevare con maggiore affidabilità la presenza di PRRSV.

Abstract

One of the most critical aspects for controlling PRRS in swine herds is represented by the reliable detection of the virus both in newly introduced animals and in the replacement of gilts. In this work RT-nested PCR technique was carried out in order to identify carrier animals. PCR detection was applied on different biological specimens: serum, bronchoalveolar flushing, oral fluid, nasal and bronchial swab were considered as useful matrices for PRRSV detection. This study was aimed to compare reliability of each kind of these specimens to detect, by mean of RT-PCR, the presence of PRRSV in a fattenig pig unit during an outbreak of PRRS.

INTRODUZIONE

Il virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS) è uno tra gli agenti patogeni più diffusi negli allevamenti suini di tutto il mondo, responsabile di una sindrome riproduttiva e respiratoria che causa gravi danni ad impatto sanitario ed economico. Nonostante siano passati più di venti anni dalla comparsa di questo virus, le conoscenze su alcuni aspetti essenziali, quali patogenesi, risposta immunitaria ed epidemiologia, appaiono ancora spesso incomplete. Data l'eterogeneità dei ceppi circolanti, la scarsa cross-protezione verso ceppi eterologhi e la limitata efficacia dei vaccini attualmente disponibili, gli strumenti più validi

per il controllo della PRRS negli allevamenti da riproduzione sono comunemente considerati l'adozione di rigide misure di biosicurezza interne ed esterne, l'adeguata gestione del *pig-flow* nell'allevamento e l'acclimatamento dei riproduttori. L'obiettivo è quello di impedire l'entrata di un nuovo ceppo virale dall'esterno, preservare la stabilità aziendale limitando la circolazione virale nell'allevamento e promuovere l'instaurarsi di una immunità protettiva nei confronti del ceppo di campo; nonché, ovviamente, mantenere lo status di negatività in un allevamento *free*.

In tale contesto il passaggio più critico consiste nell'identificare gli animali di nuova introduzione portatori e/o eliminatori di PRRSv.

Nei controlli di routine la matrice più frequentemente utilizzata per la diagnosi di PRRS, attraverso la ricerca degli anticorpi e del virus, è il siero, poiché è facile da prelevare ed è considerata economica e versatile, in quanto utilizzata anche per altre analisi.

Il siero, su cui viene applicata la RT-nested PCR (RT-PCR) per evidenziare precocemente l'infezione in fase viremica dell'animale, frequentemente può falsare la diagnosi (Duihnof *et al.*, 2011). È per questo motivo che può essere utile valutare e confrontate le prestazioni di altre matrici biologiche, quali saliva, tampone bronchiale, tampone nasale e fluido di lavaggio bronco-alveolare (BALF), al fine di migliorare l'efficacia del protocollo diagnostico applicato per evidenziare la presenza del virus negli animali al momento della loro introduzione in allevamento.

MATERIALI E METODI

Gli animali campionati per questo studio provenivano tutti da un sito 3 che ospita fino a 4000 suini per ciclo, suddivisi in 6 capannoni, in regime di TP/TV. In tale allevamento la circolazione virale di PRRS era comprovata dalla storia anamnestica delle madri dei soggetti campionati (scrofaia non indenne da PRRS), dalla sintomatologia e dalla viremia già rilevata con RT-PCR nel gruppo di suini durante i giorni della loro permanenza nel sito 2 precedenti il ristallo. La scelta di un allevamento con tali caratteristiche era stata motivata dalla necessità di reperire un numero significativo di animali naturalmente esposti all'infezione.

Lo studio è stato condotto su un campione casuale di 35 suini di genetica commerciale, identificati in modo univoco e stabulati in 7 box diversi, ma adiacenti. La numerosità campionaria è stata definita in questo modo per consentire di ottenere un limite inferiore dell'IC95% pari a 75%, per una sensibilità diagnostica attesa pari a 95%, con un errore di $\pm 5\%$.

Tutti gli animali sono stati seguiti in un *follow up* di 10 settimane (da novembre a gennaio) e sono stati sottoposti ai campionamenti di siero, tampone nasale, tampone bronchiale, BALF e fluidi orali con intervalli di 2 settimane l'uno dall'altro (6 sedute di campionamento in totale).

Gli animali, introdotti nel sito 3 a circa 10 settimane di età, sono stati sottoposti al primo campionamento (T1) a circa 12 settimane di età e peso medio di 30 Kg, risultando tutti provvisti di immunoglobuline specifiche per PRRSv. Al termine dello studio (T6) i capi avevano 22 settimane e peso medio di 80 Kg.

Modalità di prelievo dei campioni

Ciascun animale è stato adeguatamente contenuto attraverso l'utilizzo di uno stringimascella ad asta rigida e sottoposto al prelievo di sangue. In successione, si è provveduto a effettuare il tampone nasale e, con l'utilizzo di apposito morso apribocca, il tampone bronchiale, il lavaggio bronco-alveolare (BAL) e il prelievo del fluido salivare.

Il tampone bronchiale è stato effettuato attraverso l'inserimento di una sonda monouso sterile in trachea fino al livello bronchiale in modo da raccogliere il secreto bronchiale. Per effettuare il BAL è stata scelta la tecnica con accesso al polmone per via orale (Scollo *et al.*, 2011), utilizzando sonde monouso della lunghezza di circa 90 cm. Mediante l'utilizzo di una siringa monouso senza

ago è stato aspirato il fluido salivare e raccolto in provette sterili contenenti uno stabilizzatore commerciale (RNAlater, Qiagen) al fine di preservare il campione dalla degradazione dell'RNA. I campioni prelevati sono stati tutti contrassegnati con un codice univoco, trasportati in giornata a temperatura di refrigerazione e consegnati ai laboratori per l'analisi.

Estrazione RNA virale e ricerca virus

Sulle matrici siero, tampone nasale, tampone bronchiale, BALF e fluido salivare è stata effettuata la ricerca del virus della PRRS mediante RT-nested PCR descritto da Persia *et al.* (2001) e Monnier *et al.* (2005). L'RNA genomico virale è stato estratto dai sieri, dai tamponi nasali, dai tamponi bronchiali e dal BALF utilizzando l'E.Z.N.A.[®] Viral RNA Kit (Omega Bio-tek) e dai fluidi orali utilizzando il kit Rneasy[®] micro kit (Qiagen), specifico per la matrice saliva.

Valutazione della sensibilità delle matrici

Per calcolare la sensibilità relativa di ogni matrice è stato preso in considerazione il numero di capi positivi per ogni matrice alla RT-PCR per PRRSv sul totale dei capi esaminati per ogni prelievo. Per la valutazione della sensibilità è stata utilizzata l'opzione *proc freq* del software SAS[®] v9.2 utilizzando l'opzione *exact* per avere gli intervalli di confidenza al 95% calcolati con il metodo esatto.

RISULTATI

Complessivamente sono stati eseguiti 1.236 esami: 206 RT-PCR su siero, 206 RT-PCR su tampone nasale, 206 RT-PCR su tampone bronchiale, 206 RT-PCR su BALF, 206 RT-PCR su fluido salivare e 206 ELISA su siero. Nel corso dello studio, prima del T5, 2 animali sono morti e di conseguenza sono stati ottenuti dati completi (T1-T6) su 33 animali. In Tabella 1 sono rappresentati gli esiti della ricerca del PRRSv mediante RT-PCR sulle diverse matrici, ripartiti per numero di prelievo; in tutti i campioni i genomi virali rilevati corrispondevano al ceppo europeo.

Prelievo	capi con BALF+	capi con fluido salivare+	capi con siero+	capi con t.bronchiale+	capi con t.nasale +	capi totali +	Capi + / capi totali + (n)
T1	26%	11%	43%	71%	40%	94%	33/35
T2	11%	40%	34%	57%	31%	80%	28/35
T3	86%	40%	69%	71%	80%	97%	34/35
T4	51%	40%	23%	86%	34%	100%	35/35
T5	18%	21%	6%	61%	45%	88%	29/33
T6	12%	18%	3%	39%	12%	58%	19/33

Tabella 1. Prevalenza apparente e sensibilità relativa delle 5 matrici prelevate, in base al momento del prelievo (T1= 2 settimane dopo l'introduzione degli animali nel sito 3, T2= 4 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T3= 6 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T4= 8 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T5= 10 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T6= 12 settimane dopo l'introduzione nel sito 3).

Table 1. Apparent prevalence and relative sensitivity of the 5 matrices collected at different time of sampling (T1 = 2 weeks after the introduction in fattening pig unit, T2 = 4 weeks after the introduction in fattening pig unit, T3 = 6 weeks after the introduction in fattening pig unit, T4 = 8 weeks after the introduction in fattening pig unit, T5 = 10 weeks after the introduction in fattening pig unit, T6 = 12 weeks after the introduction in fattening pig unit).

Valutazione della sensibilità delle matrici

Il grafico 1 mostra, per ogni prelievo, la prevalenza apparente (percentuale di capi positivi per almeno una delle 5 matrici, indicata con la linea tratteggiata) e la sensibilità relativa di ogni matrice (percentuale di capi positivi per ogni matrice).

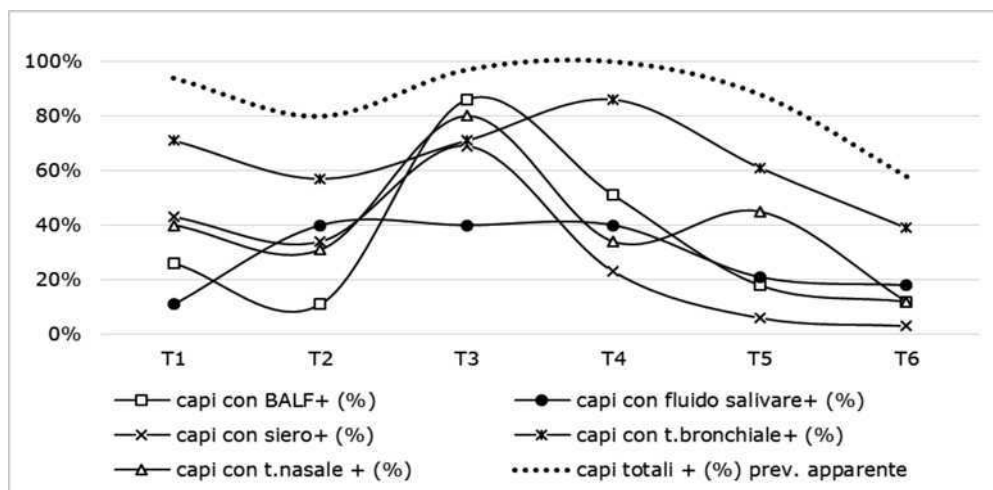


Grafico 1. Andamento della prevalenza apparente (linea tratteggiata) e sensibilità relativa delle 5 matrici considerate (BALF, fluido salivare, siero, tampone bronchiale, tampone nasale), in base al momento del prelievo

Graph 1. Apparent prevalence trend (dotted line) and relative sensitivity of the 5 matrices collected (BALF, saliva, serum, bronchial swab, nasal swab), related to the time of sampling

Come si evince dalla Tabella 1 e dal Grafico 1, le matrici che hanno permesso di rilevare il maggior numero di campioni positivi sono risultate il BALF al T3 (86.0%, IC95%= 80.3-91.7%) ed il tampone bronchiale al T4 (86.0%, IC95%=80.3-91.7%). In media, la matrice con la sensibilità relativa minore risulta il fluido salivare, mentre il tampone bronchiale ha fornito le migliori prestazioni (sensibilità relativa maggiore). Il più alto tasso di positività al virus è stato riscontrato dopo 8 settimane dall'introduzione degli animali nel sito 3 (T4), dove tutti gli animali hanno almeno una matrice biologica positiva alla RT-PCR.

L'evidenza di una attiva circolazione virale è stata dimostrata dalla presenza di viremia da PRRSv in tutti e 6 i prelievi. All'inizio dello studio (T1) la percentuale di soggetti viremici era pari al 43%, calava al 34% al T2, per raggiungere il picco del 69% al T3 e scendere infine al 3% al T6.

Valutazione della sensibilità attraverso l'interpretazione in parallelo

L'interpretazione in parallelo degli esiti ottenuti da alcune matrici consente di aumentare la sensibilità relativa.

La Tabella 3 (colonne in grigio) mostra che a T3 e T4 la sensibilità relativa aumenta fino al 94% se si valutano in parallelo gli esiti ottenuti dalle matrici tampone bronchiale e BALF. Al T3 anche l'interpretazione in parallelo tra siero e BALF raggiunge una sensibilità relativa del 94%.

Prelievo	capi con BALF+	capi con siero+	capi con t.bronchiale+	capi con BALF e/o t.bronchiale +	capi con siero e/o BALF +	capi con siero e/o t.bronchiale +	capi con BALF e/o t.nasale +	capi totali +
T1	26%	43%	71%	80%	54%	86%	57%	94%
T2	11%	34%	57%	66%	40%	69%	34%	80%
T3	86%	69%	71%	94%	94%	89%	89%	97%
T4	51%	23%	86%	94%	69%	86%	69%	100%
T5	18%	6%	61%	70%	21%	61%	55%	88%
T6	12%	3%	39%	42%	15%	39%	24%	58%

Tabella 3. Sensibilità relativa delle matrici singole e sensibilità relativa calcolata in parallelo con due matrici affiancate, in base al giorno di prelievo.

Table 3. Relative sensitivity of the individual matrices and relative sensitivity evaluated in parallel in two paired matrices, related to time of sampling.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti evidenziano una circolazione virale attiva nell'allevamento. Nei tre mesi successivi all'introduzione nel sito 3, tutti gli animali inseriti nello studio sono venuti a contatto con il virus della PRRS ed hanno avuto viremia. Pertanto tutti i soggetti testati sono stati utilizzati come *golden standard* ai fini del presente lavoro.

La viremia nel 43% dei soggetti al T1, il lieve calo delle positività al T2 ed il successivo picco al T3 suggeriscono l'ipotesi di ondate di infezioni successive all'interno del gruppo dei suini testati. Si suppone che siano stati introdotti nel sito 3 soggetti già viremici o nella fase calante dello stadio infettivo e che questi abbiano funto da serbatoio per l'infezione, stimolata anche dai fattori stressogeni derivanti dallo spostamento nel sito 3.

Il presente studio ha permesso di evidenziare che uno dei periodi più a rischio per PRRS è quello compreso tra le 12 e 20 settimane di età, interessando la prima fase del magronaggio-ingrasso. Ciò a riprova di quanto osservato in un recente studio olandese dove suini di 9-16 settimane di età si sono mostrati i soggetti ideali per rilevare il virus della PRRS in assenza di manifestazioni cliniche (Duijnhof *et al.*, 2011).

Il momento migliore per effettuare il prelievo e ottenere le migliori prestazioni con i test diagnostici corrisponde a 8 settimane dopo l'introduzione dei soggetti in allevamento, ad un'età stimata di circa 18 settimane. In tale periodo, in questo studio, tutti gli animali hanno presentato almeno una matrice biologica positiva alla RT-PCR per PRRSv.

Questo lavoro evidenzia che le differenze di sensibilità tra le matrici dipendono da molteplici fattori, tra i quali lo stadio di infezione, la sede di prelievo, la variabilità individuale e la presenza di fattori limitanti nella matrice (es. degradazione enzimatica dell'RNA nella saliva). Le matrici siero, tampone nasale e BALF presentano un picco di positività a T3, evidenziando la fase di infezione acuta. La sensibilità più alta del BALF a T3 potrebbe essere imputata alla presenza per circa il 93%, di macrofagi alveolari polmonari (PAMs, le cellule bersaglio della replicazione primaria del virus) e di linfociti (5%), neutrofili (0,5%), cellule dell'epitelio bronchiale (<1%), eosinofili e granulociti basofili (Ganter *et al.*, 1997). Nelle infezioni da PRRSv la percentuale di PAMs scende a partire da 14 dpi (*days post infection*) per poi risalire a 35 dpi. Viceversa, la percentuale di linfociti nel BALF aumenta da 21 dpi e poi cala a partire da 35 dpi (Shibata *et al.*, 1997). Gli antigeni intracellulari di PRRSv vengono rilevati sia nei PAMs che nel SF (surnatante del BALF) principalmente tra 7 e 49 dpi, mentre nel siero tra i 7 e 21 dpi. Il fatto che il PRRSv venga isolato da PAMs o SF per un periodo

più lungo rispetto al siero indicherebbe che il virus presente negli alveoli è un bersaglio meno soggetto all'azione della risposta immunitaria rispetto a quello presente nel siero contenente gli anticorpi circolanti. Inoltre, sebbene il BAL sia un prelievo molto localizzato e potenzialmente non rappresentativo dell'intero polmone (Reinhold *et al.*, 2005), Moorkamp *et al.* (2008) affermano che un esame tramite RT-PCR del BALF, proveniente perlopiù da un lobo polmonare caudale, è comparabile alle analisi del tessuto polmonare *in toto*, con il grande vantaggio di poter essere eseguito sull'animale *in vivo* (Scollo *et al.*, 2011). Tutto ciò potrebbe spiegare l'elevata capacità del BALF di evidenziare il virus nelle vie respiratorie durante lo stadio iniziale e anche fino ad alcune settimane dalla fine della fase viremica (Mengeling *et al.*, 1995). Tale risultato può fornire delle informazioni temporali sul processo infettivo eventualmente in atto, rilevanti sia dal punto di vista epidemiologico che clinico. Uno studio recente nell'uomo (Gidaris *et al.*, 2010) suggerisce l'utilizzo del BAL per la diagnosi precoce di flogosi respiratoria.

Per quanto riguarda il picco di positività dei tamponi nasali, precedenti studi confermano che la quantità di virus escreta nel muco nasale aumenta molto rapidamente e raggiunge il massimo a 2 dpi, poi diminuisce progressivamente fino a 48 dpi (Ruiz *et al.*, 2009).

La matrice più sensibile nel corso dei 6 prelievi risulta il tampone bronchiale, anche in presenza di basse quantità di virus. Tale matrice, rispetto ai tamponi nasali, proviene da parti più profonde del tratto respiratorio. Tuttavia, a differenza del BALF, risulta una matrice meno sensibile durante la fase viremica perché non preleva i macrofagi alveolari. Il motivo per cui riesca a rilevare per un periodo più prolungato il PRRSv rispetto alle altre matrici analizzate potrebbe essere attribuito alla sua composizione intrinseca. Il tampone raccoglie le secrezioni tracheo-bronchiali di un lungo tratto di vie respiratorie e può contenere tracce di cellule epiteliali, fluido salivare e secrezioni nasali. Queste sono matrici biologiche attraverso le quali il virus, che si replica anche nei linfonodi tracheo-bronchiali, può venire eliminato per via respiratoria. Sebbene ci siano risultati contrastanti, diverse pubblicazioni hanno infatti osservato cellule epiteliali bronchiali (Done *et al.*, 1995) e della mucosa nasale (Rossow *et al.*, 1996) positive all'antigene virale che, secondo Rutherford *et al.* (1993), potrebbero effettivamente rappresentare monociti/macrofagi migranti con fenotipo morfologico simile. Non è assolutamente da trascurare, inoltre, l'ipotesi che il tampone bronchiale possa rilevare il virus presente sull'epitelio delle cripte e nei follicoli delle tonsille (Halbur *et al.*, 1996).

Al momento, il fluido salivare si è mostrato essere la matrice meno prestante. Nonostante l'accorgimento di conservare i campioni con l'impiego di uno stabilizzatore, l'andamento temporale delle positività presenta un profilo anomalo caratterizzato da una fase di *plateau* quando le altre matrici hanno registrato un innalzamento delle positività. Tale osservazione potrebbe essere riconducibile alla difficoltà di ottimizzare le fasi di estrazione dell'RNA virale in questo tipo di campione (van Hout *et al.*, 2013).

Al fine di ottenere un aumento delle prestazioni diagnostiche di ciascuna matrice considerata sono stati valutati in parallelo gli esiti ottenuti da due matrici diverse. È emerso che nelle prime 4 settimane successive all'ingresso degli animali nel sito 3 la sensibilità più alta si ottiene se si testano in parallelo siero e tampone bronchiale. Ciò è dovuto al fatto che il virus è stato rilevato sia nel siero in relazione alla viremia, sia nel tampone bronchiale, dove è stato riscontrato nel corso di tutti i prelievi.

Dopo un mese dal rimescolamento si ottiene una sensibilità maggiore se si affiancano in parallelo le matrici BALF e tampone bronchiale. Come già suggerito in precedenza, il tampone bronchiale e il BALF si dimostrano matrici ottimali per la ricerca di PRRSv perché provengono entrambe da parti più profonde del tratto respiratorio rispetto al tampone nasale (Fablet *et al.*, 2011). Inoltre, poiché tali matrici rimangono positive per un periodo più lungo

rispetto alle altre, la finestra diagnostica risulta più ampia e ciò si traduce in un sensibile miglioramento delle prestazioni diagnostiche.

L'interpretazione in parallelo su siero e BALF raggiunge una sensibilità paragonabile alla combinazione tra BALF e tampone bronchiale solo al T3, dimostrando che sono due matrici molto adatte per rilevare il virus durante la fase acuta di un focolaio di PRRS. Tale dato è giustificato dalla viremia in atto, unita al picco di sensibilità del BALF che è la matrice con le concentrazioni più alte di macrofagi alveolari infetti.

CONCLUSIONI

Il presente studio dimostra che per individuare suini portatori e/o eliminatori di PRRSv non è sufficiente eseguire la ricerca del virus nel siero. È opportuno effettuare, pertanto, la ricerca del virus anche su altre matrici biologiche.

La matrice che mediamente ha fornito le migliori performances diagnostiche durante tutto il periodo considerato (primi 3 mesi della fase di magronaggio-ingrasso) risulta il tampone bronchiale, la cui tecnica di raccolta è relativamente semplice e abbastanza veloce.

Per aumentare le possibilità di rilevare capi infetti è opportuno testare in parallelo due matrici differenti. Indubbiamente, la combinazione tra BALF e tampone bronchiale presenta le migliori prestazioni, ma occorre tenere presente che la tecnica di raccolta del BALF è sicuramente indaginosa.

Una valida alternativa, nelle condizioni di campo dell'allevamento suinicolo, è rappresentata dal confronto in parallelo dei risultati ottenuti da sieri e tamponi bronchiali provenienti dagli stessi animali. La maggiore sensibilità del tampone bronchiale rispetto al siero, dovuta alla sua capacità di evidenziare il virus della PRRS nelle vie respiratorie anche dopo la fine della fase viremica, potrebbe fornire informazioni epidemiologiche e diagnostiche di grande tempestività, indipendentemente dalla fase di infezione, modificando l'approccio manageriale riguardo all'introduzione della rimonta nei siti di riproduzione oppure dei suini svezzati nel reparto magronaggio-ingrasso.

BIBLIOGRAFIA

- Done S.H., Paton D.J. (1995) "Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression". *Vet. Rec.*, 136(2):32-5.
- Duinhof T.F., van Schaik G., van Esch E.J.B., Wellenberg G.J. (2011) "Detection of PRRSv circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size". *Vet. Microb.* 150, 180-184.
- Fablet C., Marois C., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Poezevara T., Kobish M., Madec F., Rose N. (2011) "Evaluation de quatre techniques de prélèvement pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant". *Journées de la Recherche Porcine*, 283-284
- Ganter M., Hensel A. (1997) "Cellular variables in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs". *Res. Vet. Sci.* 63, 215-217.
- Gidaris D., Kanakoudi, Tsakalidou F., Papakosta D., Tzimouli V., Taparkou A., Ventouri M., Tsankas I. (2010) "Bronchoalveolar lavage in children with inflammatory and non-inflammatory lung disease". *Hippokratia*, 14, 2: 109-114.
- Halbur P.G., Paul P.S., Frey M. L., Landgraf J., Eernisse K., Meng X.J., Andrews J.J., Lum M. A., Rathje J.A. (1996) "Comparison of the antigen distribution of 2 US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad-virus". *Vet. Pathol.*, 33, 159-170.
- Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C. (1995) "Diagnosis of porcine reproductive

- and respiratory syndrome". J. Vet. Diagn. Invest., 7: 3-16.
- Monnier M., Kobal F., Ghia C.A., Buonincontro G., Gorla M. (2005) "Sindrome riproduttiva e respiratoria del suino: osservazioni preliminari per la ricerca del virus ceppo europeo nel siero mediante RT-Nested PCR". In "VII Congresso Nazionale SIDILV, Torino, 26-28 Ottobre 2005".
 - Moorkamp L., Nathues H., Spergser J., Teleger R., Grosse, Beilage E. (2008) "Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid". Vet. J., 175, 273-275.
 - Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G. (2001) "Evaluation of three RTPCR assays for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples". In: "International Symposium of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology".
 - Reinhold P., Costabel U., Hamacher J., Theegarten D., Ganter M., Rosenbruch M. (2005) "Vergleichende Aspekte der broncho-alveolären Lavage bei Mensch und Tier". Pneumologie, 59, 485-501.
 - Rossow K.D., Laube K.L., Goyal S.M., Collins J.E. (1996) "Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion". Vet. Pathol., 33, 95-9.
 - Ruiz A., Neira V., Ramirez E., Garcia A., Lecocq C., Quezada M. (2009) "Excretion and transmission study of the Chilean porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate by means of RT-nPCR and ELISA in experimentally inoculated animals and sentinels in contact". Arch. Med. Vet., 41, 221-228.
 - Rutherford M.S., Witsell A., Schook L.B. (1993) "Mechanism generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited". Journal of Leukocyte Biology, 53, 602-618.
 - Scollo A., Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Raffi V., Donna R., Gherpelli M. (2011) "Il lavaggio broncoalveolare (BAL) nel suino: due tecniche a confronto e nuove proposte per un concreto utilizzo di campo". in Atti SIPAS: "XXXIX meeting annuale SIPAS", Piacenza, 94-102
 - Shibata I., Mori M., Uruno K., Samegai Y., Okada, M. (1997) "In vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine alveolar macrophages and change in the cell population in bronchoalveolar lavage fluid after infection". J. Vet. Med. Sci., 59, 539-43.
 - Van Hout A.J.U., Franssen P.J.M., Wellen berg G.J., tempelmans Plat B.H.A., Buter G.J., van der Heijden H.M.J.F. (2013) "A comparison of oral fluids and blood samples from pigs for the detection of PRRS and PCV2 by PCR and antibody ELISA". in "16th Intern. Symposium of the WAVLD", 57.

ERADICAZIONE DELLA MALATTIA DI AUJESZKY IN TRE ALLEVAMENTI CON AUTORIMONTA: ESPERIENZE DI CAMPO

ERADICATION OF AUJESZKY DISEASE IN THREE PIG HERDS WITH INTERNAL GILTS REPLACEMENT: FIELD EXPERIENCES

GUADAGNINI G., BRESAOLA M., PAOLETTI F., SALVINI F.

DVM, PigVet, Brescia.

Parole chiave: malattia di Aujeszky, eradicazione, vaccinazione

Key words: *Aujeszky disease, eradication, vaccination*

Riassunto

La malattia di Aujeszky è tuttora un'importante sfida per veterinari ed allevatori italiani. Questo report di campo vuole riportare l'esperienza applicata in tre diversi allevamenti con autorimonta del nord Italia. Le differenti strategie vaccinali adattate alle peculiari caratteristiche strutturali e manageriali di ogni allevamento hanno portato all'eradicazione del virus della Malattia di Aujeszky da ciascun allevamento.

Abstract

Aujeszky disease is still an important challenge for Italian breeders and vets. This field experience explain our strategies applied in three different pig farms with internal gilts replacement located in the north of Italy. Different vaccinal strategies applied to the farms with peculiar facilities and management leaded to pseudorabies virus eradication.

INTRODUZIONE

La Malattia di Aujeszky è sostenuta da un Alfa2-herpesvirus che infetta il sistema nervoso centrale e altri organi come il tratto respiratorio potenzialmente di tutti i mammiferi ad eccezione dell'uomo e delle scimmie antropomorfe e trova nella specie suina l'ospite d'elezione. Le manifestazioni cliniche sono di tipo respiratorio nei suini in accrescimento; nervoso nei suinetti sottoscrofa e svezzamento e riproduttivo nelle scrofe e nei verri.

Negli ultimi anni la malattia non si è manifestata in forma classica, ma con forme più subdole responsabili soprattutto di danni economici legati alla riduzione degli incrementi ponderali, all'aumento della mortalità e dei costi sanitari per le forme respiratorie secondarie, all'aumento degli aborti e dei riassorbimenti con riduzione della portata al parto, del numero dei nati e degli svezzati. Il virus induce la produzione di anticorpi e immunità cellulo-mediata nel suino. Molte glicoproteine sono bersaglio del sistema immunitario, ma sicuramente la glicoproteina B, sempre presente nei vaccini, induce una risposta anticorpale protettiva. La scrofa trasmette gli anticorpi ai suinetti e li protegge dalla forma nervosa, limitando la replicazione virale a livello di sistema nervoso centrale (1). Grazie all'ingegneria genetica è stato messo a punto un vaccino delecto della glicoproteina E (2) ed un test ELISA in grado di differenziare se gli animali sono stati vaccinati o sono infetti da virus di campo (3). Un suino vaccinato può essere infettato dal virus di campo, ma esperienze sia pratiche che di laboratorio, indicano una significativa riduzione di nuove infezioni, fino ad un graduale raggiungimento di una sieroprevalenza pari a zero nella maggior parte degli allevamenti. Risulta, perciò, cruciale una corretta applicazione vaccinale sia a livello di allevamento che a livello di area, poiché le sottopopolazioni non vaccinate giocano un ruolo determinante nel favorire la reinfezione. E' quindi essenziale

eradicare il virus, non solo a livello di allevamento, ma anche a livello di area geografica (4). Il Piano di Controllo della Malattia di Aujeszky, che è in vigore in Italia dal 1997, prevede l'utilizzo di diverse misure di profilassi diretta e di biosicurezza associate all'applicazione di programmi vaccinali ben precisi che sfruttano l'obbligatorietà di somministrazione dei vaccini deleti e la possibilità di utilizzo di vaccini vivi attenuati per i suini in accrescimento.

Le modifiche al piano di controllo della Malattia di Aujeszky con il DM 30/12/2010 che hanno permesso l'utilizzo, seppure in momentanea deroga dei vaccini vivi attenuati anche sui riproduttori e il seguente "Piano di controllo della malattia di Aujeszky in regione Lombardia: verifica attuazione del piano vaccinale" con decreto n° 10784 del 17/11/2011 hanno dato nuovo vigore alla lotta alla malattia di Aujeszky.

Il piano di controllo nazionale 1997 ha dato i suoi frutti con un progressivo abbassamento della sieroprevalenza aziendale in Lombardia dall'83% del 1997 fino al 39% del 2004. In seguito a congiunture negative del mercato, alla comparsa di patologie altamente infettive della Lista A OIE come la Malattia Vesicolare (MVS) l'attenzione nei confronti della malattia di Aujeszky è progressivamente venuta meno: nel 2010 si registrava una sieropositività aziendale del 44,4 %, una media tra il 45% dei cicli aperti e il 43% di positività dei cicli chiusi lombardi (5).

È stato dimostrato che l'applicazione rigorosa e costante delle misure previste rappresenta un metodo efficace per l'eradicazione dell'infezione dagli allevamenti in tempi anche relativamente brevi e differenti in funzione delle diverse realtà d'allevamento.

MATERIALI E METODI

In tre aziende della Lombardia, tre allevamenti con auto-rimonta, veniva applicato rigorosamente il piano di controllo della malattia con diverse strategie in funzione delle differenti caratteristiche aziendali.

L'allevamento A un ciclo semi aperto con 500 scrofe, con rimonta interna, è organizzato in due siti il primo presenta 3 locali per gestazione in gabbia e box e 130 posti parto divisi in 12 sale parto, e 3 stanze svezzamento, numerose capannine esterne e 5 sale magronaggio; inoltre presenta 1000 posti per ingrasso. Nel secondo sito si trovano 2 capannoni da ingrasso con 400 posti ciascuno e 4 stanze di svezzamento per un totale di 1000 svezzati; inoltre esiste un piccolo capannone da ingrasso con 4 stanze da 30 grassi ciascuna.

L'allevamento B è un ciclo semi chiuso di 500 scrofe, con rimonta interna, diviso anch'esso in due siti. Il primo sito presenta 15 sale parto per un totale di 150 posti parto, 3 gestazioni in gabbie e box, 28 capannine di svezzamento di differenti dimensioni, un piccolo centro verri aziendale e un magronaggio con circa 200 posti. Il secondo sito è un ingrasso che dista circa 30 km diviso in 3 capannoni con circa 1500 posti da ingrasso.

L'allevamento C è un ciclo chiuso di 300 scrofe con 6 sale parto per un totale di 84 posti parto, 4 svezzamenti e 4 capannine esterne, 3 magronaggi e due ingrassi divisi in 6 settori con circa 3000 animali presenti.

Tutti i tre allevamenti sono situati in Lombardia tra le province di Brescia e Cremona, in zone ad altissima densità suinicola e ad alta sieroprevalenza di Malattia di Aujeszky.

Tutti i tre allevamenti presentavano sieropositività sui riproduttori ed attiva circolazione del virus di campo tra svezzamento, magronaggio ed ingrasso.

In tutti i tre allevamenti veniva applicata la vaccinazione dei riproduttori con differenti vaccini, i suinetti venivano sottoposti alle prime due vaccinazioni come previste dal piano di controllo, tuttavia la terza vaccinazione veniva eseguita solo saltuariamente.

In base alla struttura degli allevamenti sono stati applicate differenti strategie per eradicare la malattia di Aujeszky dai 3 allevamenti, ma in tutti gli allevamenti è stata applicata rigorosamente la vaccinazione, con somministrazione del vaccino ai riproduttori ogni 3 mesi con aghi di 4 cm e

ai suinetti con aghi di 2 cm con 3 settimane di intervallo tra la prima e la seconda vaccinazione. La terza vaccinazione è stata eseguita secondo normativa tra il sesto e il settimo mese di età degli animali. L'età di somministrazione del primo intervento vaccinale è stato stabilito in tutti gli allevamenti mediante sierologia per Malattia di Aujeszky. Il posizionamento di tale vaccinazione differiva tra i tre allevamenti. Tutte le vaccinazioni sono state eseguite secondo buone pratiche di vaccinazione e sotto il controllo e supervisione del veterinario aziendale.

Nell'allevamento A è stata applicata la strategia vaccinale sopra descritta, sui riproduttori è stato utilizzato un vaccino vivo attenuato contenente virus della malattia di Aujeszky ceppo Begonia compreso tra $10^{5.5}$ TCID₅₀ e $10^{6.5}$ TCID₅₀, adiuvato con dl-alfa-tocoferolo acetato, mentre nei suinetti è stato utilizzato un vaccino vivo attenuato contenente virus della malattia di Aujeszky ceppo Begonia compreso tra $10^{5.5}$ TCID₅₀ e $10^{6.5}$ TCID₅₀ non adiuvato, con posizionamento del primo intervento vaccinale a 75 giorni dalla nascita.

Le scrofette che precedentemente venivano allevate a contatto con i suini da ingrasso nella fase di post-svezzamento e magronaggio sono state segregate dopo la fase post-svezzamento, attorno ai 65 giorni e quindi sotto la protezione dell'immunità materna.

Le scrofette sono state isolate in stanze di magronaggio dedicate, senza la possibilità di contatto con altri magroni, in seguito al raggiungimento dei 50 kg sono state portate nel secondo sito dell'azienda ed isolate nel capannone con piccole stanze da 30 animali ciascuno.

Al momento della fecondazione sono state riportate nel primo sito dell'azienda e isolate in una gestazione libera dedicata alle primipare.

Nell'allevamento B è stata applicata la strategia vaccinale precedentemente descritta, il vaccino utilizzato sia sui riproduttori che sui suinetti in accrescimento è stato un vaccino vivo attenuato contenente virus della malattia di Aujeszky ceppo Bartha gE- con titolo non inferiore a $10^{6.3}$ DICC₅₀, adiuvato con mercuriotolato sodico e olio leggero di paraffina. Il posizionamento del primo intervento vaccinale, in seguito all'analisi sierologica per individuare il calo dell'immunità materna, è stato determinato a circa 70 giorni dalla nascita.

Inizialmente le scrofette condividevano l'accrescimento con i suini da ingrasso, attorno ai 40 kg venivano spostate nell'ingrasso situato a 30 km e quindi riportate in scrofaia dopo il raggiungimento della pubertà attorno ai 120 kg e ai 7 mesi di vita.

Per evitare la contaminazione delle scrofette a contatto con i grassi, si è deciso di rivedere ed implementare la strategia vaccinale in allevamento e di isolare le scrofette nel magronaggio presente nel medesimo sito di nascita. Dopo i 30 Kg e dopo l'esecuzione della prima vaccinazione per malattia di Aujeszky le scrofette venivano segregate e tenute isolate fino al primo ciclo estrale dove venivano spostate in gestazione.

In fase iniziale la strategia ha mostrato una negativizzazione delle scrofette al ceppo di selvaggio della malattia di Aujeszky, di cui contemporaneamente si era rallentata la circolazione grazie alla strategia di vaccinazione nel resto dei riproduttori. Tuttavia seguenti controlli hanno evidenziato una nuova sieroconversione delle scrofette al virus selvaggio dopo la fecondazione, con comparsa di sintomatologia riproduttiva sulle stesse.

Un'importante revisione delle pratiche vaccinali e dei flussi degli animali all'interno dell'allevamento ha messo in evidenza la falla nel sistema di protezione della rimonta.

Le scrofette talvolta troppo giovani per il terzo intervento vaccinale venivano spostate in gestazione per la stimolazione estrale e la conseguente copertura. La mancanza di protezione vaccinale esponeva la rimonta a continue reinfezioni.

Nell'allevamento C è stata applicata la strategia vaccinale precedentemente descritta, il vaccino utilizzato sia sui riproduttori che sui suinetti in accrescimento è stato un vaccino vivo attenuato contenente virus della malattia di Aujeszky ceppo LomBart con titolo non inferiore a $10^{5.5}$ DICT₅₀ somministrato in abbinamento ad un vaccino spento per influenza contenente

coltura inattivata di ceppi influenzali H1N1 e H3N2 (400UA) adiuvato con alluminio idrossido gel. L'analisi dell'immunità materna nei suinetti per il posizionamento del primo intervento vaccinale ha mostrato un decadimento dell'immunità attorno ai 75-80 giorni. Il decadimento dell'immunità materna e quindi la somministrazione del primo intervento vaccinale coincideva con la messa a terra in magronaggio.

Tuttavia un'attiva circolazione di ceppo selvaggio in magronaggio esitava in una costante infezione sia dei lattoni che delle scrofette che venivano allevate a contatto.

Un'analisi delle strutture aziendali non permetteva di posticipare la messa a terra, quindi si è deciso di modificare il piano vaccinale e di anticipare di circa 15 gg il primo intervento vaccinale e di eseguire il secondo intervento vaccinale subito dopo la messa a terra.

Questa strategia ha dato un iniziale miglioramento, ma somministrando la prima dose vaccinale in presenza di anticorpi materni risultava una protezione degli animali scarsa e poco duratura nel tempo. Per prolungare la protezione dei suinetti e delle scrofette si è deciso di fare un terzo richiamo vaccinale un mese dopo il secondo. Per questa terza vaccinazione anticipata è stato utilizzato un vaccino vivo attenuato contenente virus della malattia di Aujeszky ceppo Begonia compreso tra $10^{5.5}$ TCID50 e $10^{6.5}$ TCID50, adiuvato con dl-alfa-tocoferolo acetato.

Il terzo intervento che veniva eseguito in precedenza sui suini di sei mesi di età e attorno ai 90 kg di vita è divenuto il quarto ed è stato spostato in avanti di circa 40-50 giorni. Per questo intervento vaccinale, posizionato su suini di più di 7 mesi e attorno ai 120 kg di peso è stato utilizzato un vaccino vivo attenuato contenente virus della malattia di Aujeszky ceppo LomBart con titolo con titolo non inferiore a $10^{5.5}$ DICT50, non adiuvato.

Tab 1. differenti strategie vaccinali e gestionali a confronto.

Tab 1. *comparison of different vaccinal and managerial strategies*

ALLEVAMENTO A	Ceppo Begonia con titolo tra $10^{5.5}$ TCID50 e $10^{6.5}$ TCID50 Adiuvato e non	Segregazione in altro sito aziendale delle scrofette
ALLEVAMENTO B	Ceppo Bartha gE- con titolo almeno $10^{6.3}$ DICC50 adiuvato	Segregazione all'interno dell'allevamento
ALLEVAMENTO C	Ceppo LomBart con titolo almeno $10^{5.5}$ DICT50 in associazione a virus dell'influenza suina H1N1 e H3N2 (400UA)	4 interventi vaccinali ripetuti in suini in accrescimento
	Ceppo Begonia con titolo tra $10^{5.5}$ TCID50 e $10^{6.5}$ TCID50 Adiuvato	

RISULTATI

Nell'allevamento A la segregazione delle scrofette nel secondo sito dell'azienda, abbinata ad una efficace strategia vaccinale che ha bloccato la circolazione di virus selvaggio in azienda ha permesso l'introduzione di rimonta gE negativa. L'aver isolato le primipare in una gestazione a loro dedicata ha ulteriormente favorito la mancanza di contagio tra primipare negative e resto della mandria.

La strategia utilizzata nell'allevamento B ha senza dubbio richiesto un'applicazione rigida del protocollo vaccinale e delle buone pratiche di vaccinazione. La mancata esecuzione del terzo intervento vaccinale prima dello spostamento in gestazione poneva le scrofette in uno stato di insufficiente protezione e ha condotto ad una reinfezione della rimonta.

Un'analisi dei punti critici ha evidenziato questa falla nella gestione della rimonta, l'introduzione della terza vaccinazione prima dello spostamento in gestazione e non vincolato al raggiungimento del sesto mese di età ha fatto sì che si bloccasse definitivamente la circolazione del ceppo selvaggio in allevamento e si arrivasse in un tempo relativamente breve alla eradicazione della malattia di Aujeszky.

La strategia vaccinale utilizzata nell'allevamento C ha permesso di liberare il magronaggio dalla forte pressione del virus selvaggio proteggendo suini in accrescimento e le scrofette per l'autorimonta. Il conseguente spostamento del quarto intervento vaccinale ha progressivamente protetto tutti i suini all'ingrasso compresi i gruppi di suini che venivano macellati ben oltre il nono mese di vita. Dopo 6 mesi di piano vaccinale straordinario sono stati riposizionati i primi due interventi vaccinali ed è stata sospesa la terza vaccinazione con vaccino vivo attenuato adiuvato. La contemporanea negativizzazione della rimonta interna ha permesso di inserire scrofette negative al virus selvaggio e ben protette dalla profilassi vaccinale. In due anni con continua riforma dei riproduttori gE positivi si è giunti ad una totale eradicazione della patologia.

CONCLUSIONI

L'applicazione rigorosa della vaccinazione secondo le buone pratiche di vaccinazione è stata senza dubbio la chiave per bloccare la circolazione di virus selvaggio in tutti i tre allevamenti, come mostrato anche dall'esperienza olandese che ha basato il proprio piano di controllo ed eradicazione della Malattia di Aujeszky sulla vaccinazione obbligatoria con vaccino delecto (6,7).

La figura del veterinario aziendale è stata altrettanto significativa nell'analizzare le necessità di ogni azienda e adeguando le differenti strategie di intervento alle specifiche possibilità strutturali e gestionali di ogni allevamento.

L'eradicazione della Malattia di Aujeszky è una pratica possibile a livello di singolo allevamento anche in zone ad elevata densità suina, anche se l'eradicazione di un tale patogeno deve necessariamente riguardare non un singolo allevamento (6,7), ma tutto il territorio; poiché in caso contrario permane un'importante rischio di reinfezione per gli allevamenti negativi.

BIBLIOGRAFIA

1. Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (2006) "Diseases of swine" 9th edition, Ames, Iowa Usa, Blackwell Publishing
2. Quint W., Gielkens A., Van Oirschot J., Berns A., Cuypers H.T. (1987) "Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of "live" vaccines" J. Gen. Virol. 68, 523-534.
3. Morekov O.S., Sobko Y.A., Panchenko O.A. (1997) "Glycoprotein gE blocking Elisas to differentiate between Aujeszky's disease-vaccinated and infected animals" J. Vir. Meth. 65, 83-94
4. Pensaert M., Morrison R.B. (2000) "Challenges of the final stages of the ADV eradication program" Vet. Res. 31, 141-145.
5. Alborali L., Bellini S., Zanoni M., Tamba M., Cordioli P. (2010) "Malattia di Aujeszky: evoluzione delle attività di controllo" L'Osservatorio anno 13 -n° 2, 28-32
6. Stegeman J.A. (1997) "Aujeszky's disease (pseudorabies) virus eradication campaign in the Netherlands" Vet. Microbiol. 55, 175-180.
7. Elbers A.R.W., Braamskamp J., Dekkers L.J.M., Voets R., Duinhof T., Hunneman W.A., Stegeman J.A. (2000) "Aujeszky's disease virus eradication campaign successfully heading for last stage in the Netherlands" Vet. Quart. 22, 103-107

**EFFETTO DEL TRATTAMENTO DI MASSA CON
GONADOTROPINE NELLA SCROFA A DIFFERENTI INTERVALLI
DI TEMPO DALLO SVEZZAMENTO**

***EFFETC OF MASS TREATMENT WITH GONADOTROPINS
ADMINISTERED TO SOWS AT DIFFERENT TIME INTERVALS
AFTER WEANING***

SCOLLO, A.^{1,2}, CONTIERO, B.², CASAPPA, P.³, AVANZINI, C.¹, VALERIA, R.¹,
MAZZONI, C.¹

¹Medico Veterinario Suivet;

²Università di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute;

³Ceva Salute Animale

Parole chiave: Scrofa, gonadotropine, sincronizzazione estro, primipara.

Key words: Sow, gonadotropins, oestrus synchronization, primiparous.

Riassunto: La causa della riduzione delle performance riproduttive della scrofa dopo lo svezzamento sembra essere legata il più delle volte alla soppressione della produzione di gonadotropine (Gn) per insufficiente sviluppo follicolare, e dall'inattività ovarica; scopo del presente lavoro è verificare l'efficacia di un trattamento di massa con Gn valutando l'effetto della somministrazione a 12 o 24 ore post-svezzamento. Nella prova sono state coinvolte 251 scrofe con ordine di parto compreso tra uno e tredici: un primo gruppo (gruppo 12h, N = 85) ha ricevuto una somministrazione per via intramuscolare di 5 ml contenenti 400 UI di eCG e 200 UI di hCG una sola volta 12 ore dopo lo svezzamento; un secondo gruppo (gruppo 24h, N = 84) ha ricevuto la stessa unica somministrazione 24 ore dopo lo svezzamento; un terzo ed ultimo gruppo (gruppo controllo, N = 82) non ha ricevuto alcuna somministrazione di Gn dopo lo svezzamento. L'uso di Gn a 24 ore dallo svezzamento è risultato essere più efficace dell'uso a 12 ore sia per le primipare che per le pluripare. Il più ristretto range di insorgenza del calore consente di ottimizzare il management delle inseminazioni, facilitandone così la delicata gestione. Inoltre, le scrofe primipare hanno mostrato ulteriori vantaggi legati al maggiore percentuale di scrofe in calore entro gli 8 giorni dallo svezzamento (P = 0,062), un ISE più breve (P = 0,001) ed una migliore portata al parto (P = 0,042), suggerendo l'efficacia di un intervento di massa routinario con Gn soprattutto in questa categoria di animali.

Abstract: The cause of reduction in reproductive performance of the sow after weaning seems to be linked to the suppression of the production of gonadotropins (Gn) for insufficient follicular development and ovarian inactivity; aim of this work was to test the efficacy of a mass treatment with Gn evaluating the effect of the administration 12 or 24 hours post-weaning. In the trial were involved 251 sows with parity ranged from one to thirteen: a first group (12h group, N = 85) received an intramuscular injection of 5 ml containing 400 IU of eCG and 200 IU of hCG 12 hours after weaning, a second group (group 24h, N = 84) received the same single dose 24 hours after weaning, a third and last group (control group, n = 82) received no administration of Gn after weaning. The use of Gn 24 hours after weaning was found to be more effective than the use at 12 hours for both primiparous than for multiparous. A narrower range of onset of heat was found, and

it could be useful to optimize the management of insemination. In addition, primiparous sows showed additional benefits of the higher percentage of sows in oestrus within 8 days after weaning ($P = 0.062$), an shorter ISE ($P = 0.001$) and improved farrowing rate ($P = 0.042$), suggesting the effectiveness of a routine mass treatment with Gn especially in this category of animals.

INTRODUZIONE

La riduzione delle performance riproduttive della scrofa è una problematica legata a svariati fattori, tra cui la stagione (Love et al., 1993; Xue et al., 1994), la durata della lattazione e l'ordine di parto (Koketsu e Dial, 1997; Knox et al., 2001). Ciò può determinare un basso numero di scrofe che manifestano il calore, un aumentato intervallo tra lo svezzamento e l'estro ed un elevato tasso di ritorni in calore dopo l'inseminazione, che nel complesso si traducono in una minore portata al parto. La causa sembra essere legata il più delle volte alla soppressione della produzione di gonadotropine (Gn) per insufficiente sviluppo follicolare, e dall'inattività ovarica; negli ultimi anni dunque la ricerca ha indirizzato la propria attenzione verso protocolli di sincronizzazione dell'estro che prevedano l'utilizzo di gonadotropine per stimolare l'attività gonadale. A tal proposito, sono numerosi gli studi che indagano l'efficacia delle Gn nelle scrofe dopo lo svezzamento, sia tramite la somministrazione di eCG (Britt, 1986; Sechin et al., 1999) che dell'associazione eCG e hCG (Bates et al., 1991; Kirkwood et al., 1998). Tuttavia sembrano esserci pareri contrastanti sull'esatto intervallo di tempo che deve intercorrere tra lo svezzamento e la loro somministrazione per indurre un rapido e sincronizzato estro; alcuni autori descrivono infatti protocolli che ne prevedono l'utilizzo il giorno stesso dello svezzamento (Kirkwood et al., 1998), mentre altri suggeriscono che la somministrazione ottimale sia il giorno dopo (Karlberg et al., 1994). Scopo del presente lavoro è verificare l'efficacia di un trattamento di massa con Gn (eCG 80UI/ml e hCG 40UI/ml) valutando l'effetto della somministrazione a 12 o 24 ore post-svezzamento. I dati produttivi degli animali sono stati poi registrati fino al parto seguente.

MATERIALI E METODI

Animali e management

Lo studio è stato condotto in un allevamento suinicolo commerciale a ciclo aperto, osservando le norme minime sulla protezione dei suini indicate dalla legislazione vigente (EU Commission, 2008). Nella prova sono state coinvolte 251 scrofe di genetica ibrida commerciale Large White × Landrace, con ordine di parto compreso tra uno e tredici. Gli animali erano stati spostati allo svezzamento dalle sale parto alle gabbie gestazione convenzionali, situate all'interno di un capannone a ventilazione naturale con pavimentazione parzialmente in grigliato, mantenendo 8 ore di luce al giorno all'intensità di 300 lux. L'alimentazione era somministrata con sistemi automatizzati due volte al giorno (alle ore 07:00 e alle ore 16:00) secondo una formulazione standard per lo specifico momento riproduttivo. L'acqua era a disposizione *ad libitum* tramite un abbeveratoio a spillo. Le scrofe sono state suddivise in tre gruppi di prova, all'interno dei quali gli ordini di parto erano egualmente distribuiti: un primo gruppo (gruppo 12h, $N = 85$) ha ricevuto una somministrazione per via intramuscolare di 5 ml contenenti 400 UI di eCG e 200 UI di hCG (Gn) (Fertipig®, Ceva) una sola volta 12 ore dopo lo svezzamento; un secondo gruppo (gruppo 24h, $N = 84$) ha ricevuto la stessa unica somministrazione 24 ore dopo lo svezzamento; un terzo ed ultimo gruppo (gruppo controllo, $N = 82$) non ha ricevuto alcuna somministrazione di Gn dopo lo svezzamento.

In seguito, è stata effettuata la ricerca degli estri con il verro due volte al giorno (alle ore 08:00 e alle ore 16:00); la registrazione della venuta in calore è stata effettuata alla manifestazione del riflesso dell'immobilità da parte dell'animale e delle tipiche caratteristiche dell'estro descritte da Signoret (1970). Alla manifestazione del calore, le scrofe sono state fecondate in presenza del verro, con inseminazione artificiale convenzionale, con cateteri a spugna e buste monodose da 90 ml per $2,6 \times 10^6$ spermatozoi vivi e vitali in *extender* a lunga conservazione. Il seme refrigerato, utilizzato entro le 24 ore dal prelievo, è stato depositato nelle vie genitali femminili con una prima dose al rilevamento dell'estro, ed a distanza di 24 ore con una seconda dose secondo il protocollo suggerito da Almeida et al. (2000). Gli animali sono stati dunque monitorati per l'intera gravidanza e gli eventuali ritorni in calori o aborti annotati. Oltre all'intervallo tra lo svezzamento e l'insorgenza del calore (ISE), sono stati valutati i principali parametri riproduttivi degli animali, quali la fertilità ecografica, la portata al parto e la percentuale di calori entro l'ottavo giorno post trattamento. Inoltre, sono stati raccolti al parto i dati relativi al numero di nati totali, nati vivi, nati morti e mummificati per ciascuna scrofa.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati dividendo gli animali in primipare (scrofe che avevano sostenuto il primo parto) e pluripare. Per l'ISE è stata svolta una analisi non parametrica di Kruskal Wallis. Per le percentuali di scrofe in calore entro gli 8 giorni dall'estro, la fertilità ecografica e la portata al parto è stato invece effettuato una test chi-quadro con Marasquillo. Per il numero di nati vivi, nati morti e mummificati invece è stato utilizzato il t-test. La variabile ISE è stata successivamente analizzata anche con il test chi-quadro con Marasquillo per il confronto tra proporzioni di scrofe entro ciascun giorno di venuta in calore.

RISULTATI

I parametri significativi per le primipare sono stati la media di ISE ($P = 0,001$), la portata al parto (0,042) e, seppur con significatività sulla soglia, la frequenza di calori manifesti entro l'ottavo giorno post-svezzamento ($P = 0,062$). Per le pluripare invece si è mostrato differente tra i gruppi di trattamento il numero di nati morti ($P = 0,003$; Tabella 1). L'ISE delle primipare è stato molto inferiore nel gruppo Gn 24h rispetto agli altri due gruppi; sempre nel Gn 24h si è registrata la migliore portata al parto. Il gruppo controllo ha invece manifestato una percentuale lievemente inferiore di calori entro gli 8 giorni post-svezzamento. Per le pluripare si è osservata una minore natimortalità nel gruppo con Gn a 12 ore dallo svezzamento. L'analisi per il confronto tra frequenze di scrofe entro ciascun giorno di venuta in calore ha evidenziato per le primipare nel gruppo Gn 24h una forte concentrazione di calori nel giorno 4 dopo lo svezzamento rispetto al gruppo controllo ($P = 0,015$), con un 82,2% degli animali venuti in calore tra il 4° ed il 5° giorno (Grafico 1A). La venuta in calore delle primipare del gruppo controllo invece si è più uniformemente distribuita nei giorni 3, 4 e 5. Anche le pluripare del gruppo Gn 24h hanno mostrato più calori il quarto giorno dopo lo svezzamento (Grafico 1B), mentre il gruppo controllo ha mantenuto una distribuzione meno concentrata e più ritardata, collocando un buon numero di calori anche il giorno 5 ($P = 0,010$).

Tabella 1. Dati produttivi delle scrofe primipare e pluripare appartenenti ai tre gruppi di trattamento.

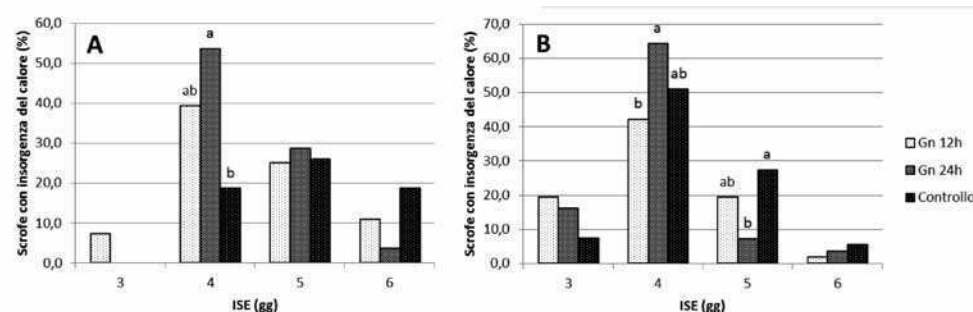
Table 1. Productive data of primiparous and pluriparous sows per treatment group.

Parametri riproduttivi	Primipare				Pluripare			
	Gn 12h	Gn 24h	Controllo	P value	Gn 12h	Gn 24h	Controllo	P value
Scrofe (n°)	28	28	27		57	56	55	
Calori entro 8 gg (%)	85,7 ^a	85,7 ^a	70,4 ^b	0,062	84,2	92,7	94,5	ns
ISE, media (gg)	7,9 ^{ab}	5,8 ^b	8,6 ^a	0,001	6,6	4,9	4,6	ns
Fertilità ecograf. (%)	89,3	96,4	88,9	ns	96,5	96,4	90,9	ns
Portata al parto (%)	88,9 ^{ab}	99,0 ^a	83,3 ^b	0,042	91,8	92,7	90,6	ns
Nati vivi, media (n°)	11,3	12,5	12,2	ns	12,1	11,9	11,9	ns
Nati morti, media (n°)	1,1	1,0	1,3	ns	0,9 ^b	1,4 ^a	1,4 ^a	0,003
Mummificati, media (n°)	0,0	0,1	0,2	ns	0,2	0,1	0,2	ns

ns = non significativo ($P > 0,05$); ^{a,b} lettere diverse indicano differenza statisticamente significativa

Grafico 1. Analisi della distribuzione degli intervalli tra lo svezzamento ed il calore.

Graph 1. Distribution analysis of time intervals between weaning and oestrus.



A: Scrofe primipare; B: Scrofe pluripare; ^{a,b} lettere diverse indicano differenza statisticamente significativa

DISCUSSIONE

L'analisi dei dati effettuata considerando le scrofe primipare e le scrofe pluripare come due differenti popolazioni, ha permesso di evidenziare alcuni aspetti importanti da tenere in considerazione per l'uso delle Gn post-svezzamento. I soggetti che maggiormente hanno beneficiato delle Gn sono stati infatti le scrofe primipare con somministrazione 24 ore dopo lo svezzamento. Questo gruppo di animali ha manifestato una maggiore percentuale di scrofe in calore entro gli 8 giorni post-svezzamento, un inferiore ISE ed elevata portata al parto in confronto al gruppo controllo ed al gruppo Gn 12h. I risultati confermano quanto riportato anche da altri autori (Vargas et al., 2006; Estienne e Hartsock, 1998) che hanno utilizzato le Gn a 24 h dallo svezzamento. Secondo quanto emerso nel presente lavoro, l'utilizzo di Gn a 24h nelle primipare migliora le prestazioni di una categoria di animali considerata problematica nella maggior parte delle aziende. Infatti, è molto comune riscontrare nelle scrofe al termine del primo parto un maggiore ISE ed una ridotta portata al parto rispetto agli animali più anziani (Koketsu e Dial, 1997, Kemp e Soede, 2004). Normalmente, negli animali con una buona condizione corporea, la secrezione fisiologica di Gn dopo lo svezzamento aumenta, con conseguente sviluppo follicolare, produzione di estradiolo e picco di LH, che culminano nella manifestazione dell'estro solitamente entro il settimo giorno post-svezzamento. Tuttavia Vasseur et al. (1994) descrivono come la primipara sia più soggetta alla perdita di peso durante la prima lattazione. Questa perdita di peso, unitamente ad un non sufficiente apporto energetico con la dieta, va ad interferire con il livello di LH sierico a 21 giorni di lattazione (Tokach et al., 1992) e si conclude con un aumentato ISE. Inoltre, lo stato metabolico della primipara durante la lattazione può essere responsabile di un limitato sviluppo follicolare e di un incompleto recupero dell'asse riproduttivo allo svezzamento, con conseguente insorgenza della cosiddetta Sindrome del secondo parto (SSP) (Willis et al., 2003). Sebbene nel presente lavoro non siano disponibili i dati relativi all'eventuale insorgenza della SSP nelle primipare, Vargas et al. (2006) hanno dimostrato come l'incidenza della sindrome sia minore nelle scrofe alle quali sono state somministrate le Gn.

Le performance ottenute nel gruppo Gn 24h delle primipare sono state migliori non solo rispetto al gruppo controllo, ma anche rispetto al Gn 12h. I risultati confermano quanto precedentemente suggerito da Karlberg et al. (1994), che individuava nelle 24 ore successive allo svezzamento il momento ideale per la somministrazione di Gn. Contrariamente a quanto sostenuto da Kirkwood e Giebelhaus (1998) dunque, la scelta della corretta tempistica di somministrazione nelle primipare non dovrebbe essere legata esclusivamente a scelte di facilitazione manageriale bensì dettata dal migliore effetto ottenuto a 24 ore.

Per quanto riguarda la distribuzione dei calori delle primipare nei giorni successivi allo svezzamento, i risultati pongono nuovamente a favore della somministrazione di Gn a 24 ore. Infatti, la quasi totalità degli animali ha manifestato l'estro tra il quarto ed il quinto giorno, con la maggiore concentrazione il quarto giorno. Engl et al. (2010) suggeriscono il potenziale tornaconto ottenibile dalla concentrazione delle inseminazioni in un arco di tempo minore. Come riportato da Degenstein et al. (2008), l'ottenimento di calori ravvicinati permetterebbe di focalizzare maggiormente l'attenzione zootecnica e valutare con maggior precisione il momento delle ovulazioni, conseguentemente anch'esse più ravvicinate, ottimizzando al massimo il management di questa delicata fase. L'adozione di un protocollo di inseminazione artificiale con scarso margine di errore rappresenta infatti il valore aggiunto dell'efficacia dell'induzione dell'estro; il fine ultimo delle ricerche in questo campo, empiricamente, è l'ulteriore restringimento di questo intervallo

per l'utilizzo di una singola dose di seme (Degenstein et al., 2008).

Sebbene i risultati produttivi delle Gn nelle pluripare siano meno evidenti rispetto alle primipare, l'effetto di concentrazione dei calori osservati in queste ultime non solo si ripropone nuovamente a favore del gruppo Gn 24h, ma è addirittura più accentuato. Infatti, una percentuale consistente di pluripare ha manifestato l'estro il quarto giorno (64,3%). Anche per questa categoria di animali sono dunque validi i vantaggi appena descritti per le primipare.

In conclusione, l'uso di Gn a 24 ore dallo svezzamento è risultato essere più efficace dell'uso a 12 ore sia per le primipare che per le pluripare. Il più ristretto range di insorgenza del calore consente di ottimizzare il management delle inseminazioni, facilitandone così la delicata gestione. Inoltre, le scrofe primipare hanno mostrato ulteriori vantaggi legati al maggiore percentuale di scrofe in calore entro gli 8 giorni dallo svezzamento, un ISE più breve ed una migliore portata al parto, suggerendo l'efficacia di un intervento di massa routinario con Gn soprattutto in questa categoria di animali.

BIBLIOGRAFIA

- Almeida, F., R.C.L., Novak, S., Foxcroft, G.R., The time of ovulation in relation to estrus duration in gilts, *Theriogenology*, 7, 1389–1396, 2000.
- Bates, R. O., B. N. Day, J. H. Britt, L. K. Clark, and M. A. Brauer. 1991. Reproductive performance of sows treated with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin at weaning in the summer. *J. Anim. Sci.* 69:894–898.
- Britt, J. H. 1986. Improving sow productivity through management during gestation, lactation and after weaning. *J. Anim. Sci.* 63:1288–1296.
- Consiglio dell'Unione Europea, Consiglio Direttivo 2008/120/EC del 18 dicembre 2008 che stabilisce le norme minime sulla protezione dei suini, *Official Journal* 316, 36-38, 2008.
- Degenstein, K.L., O'Donoghue, R., Patterson, J.L., Beltranena, E., Ambrose, D.J., Foxcroft, G.R., Dyck, M.K., Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effects on reproductive function, *Theriogenology*, 70, 1075-1085, 2008.
- Engl, S., Bischoff, R., Zaremba, W., 2010. Use of a new GnRH to control reproduction in gilts, *Proceedings of the 21th IPVS Congress, Vancouver, Canada*, P778.
- Estienne MJ, Hartsock TG. Effect of exogenous gonadotropins on the weaning-to-estrus interval in sows. *Theriogenology* 1998;49:823–8.
- Karlberg K, Skei HR, Schie KA, Bock R. Should oestrus induction treatment with PMSG/HCG be given on the day of weaning or on the following day? *Proc 12th Cong IPVS*. 1994.
- Kemp B, Soede NM. Reproductive problems in primiparous sows. In: 18th congress of international pig veterinary society; 2004.p. 843–8.
- Kirkwood, R. N., F. X. Aherne, and G. R. Foxcroft. 1998. Effect of gonadotropin at weaning on reproductive performance of primiparous sows. *Swine Health Prod.* 6:51–55.
- Kirkwood, RN, Giebelhaus RJ, 1998. Day of injection does not affect the response of weaned sows to PG600. *Swine Health and Production*. 1998;6(4):171–173.
- Knox, R V, S L Rodriguez-Zas, G M Miller, K L Willenburg and J A Robb, 2001. Administration of p.g. 600 to sows at weaning and the time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. *J Anim Sci* 2001, 79:796-802.
- Koketsu, Y., G. D. Dial. 1997. Factors influencing the postweaning reproductive performance of sows on commercial farms. *Theriogenology* 47:1445–1461.
- Love, R. J., G. Evans, and C. Kluiec. 1993. Seasonal effects on fertility in gilts and sows. *J Reprod. Fertil. (Suppl. 1)* 48:191–206.

Sechin, A., J. C. Deschamps, T. Lucia, Jr., J. A. G. Aleixo, and V. Bordignon. 1999. Effect of equine chorionic gonadotropin on weaning-to-first service interval and litter size in female swine. *Theriogenology* 51:1175–1182.

Signoret, J.P., Reproductive behavior of pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 11, 105-107, 1970.

Tokach, M.D., Pettigrew, J.E., Dial, G.D., Wheaton, J.E., Crooker, B.A. And Johnson, L.J., 1992. Characterization of luteinizing hormone secretion in the primiparous, lactating sow: relationship to blood metabolites and return-to-estrus interval. *Journal of Animal Science*, 70: 2195-2201.

Vargas AJ, ML Bernardi, I Wentz, GB Neto, FP Bortolozzo, 2006. Time of ovulation and reproductive performance over three parities after treatment of primiparous sows with PG600. *Theriogenology* 66 (2006) 2017–2023.

Vesseur PC. Causes and consequences of variation in weaning to oestrus interval. Ph.D. thesis. Wageningen University; 1997.

Willis HJ, LJ Zak, GR Foxcroft, 2003. Duration of lactation, endocrine and metabolic state, and fertility of primiparous sows. *J Anim Sci* 2003 Vol. 81 No. 8 2088-2102.

Willis HJ, Zak LJ, Foxcroft GR. Duration of lactation, endocrine and metabolic state, and fertility of primiparous sows. *JAnim Sci* 2003;81:2088–102.

Xue, J., G. D. Dial, W. E. Marsh, and P. R. Davies. 1994. Multiple manifestations of season on reproductive performance of commercial swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:1486–1489.

EFFETTI DELL'IMPIEGO DEL SEME MORTO SULLA FERTILITÀ E SULLA PROLIFICITÀ DELLA SCROFETTA

EFFECT OF THE USE OF DEAD SEMEN, ON FERTILITY AND PROLIFICACY IN GILTS

MAZZONI C.¹, SCOLLO A.¹, TONON F.¹, GHERPELLI M.¹, BONILAURI P.²,
DE RENSIS F.³

¹Medico Veterinario libero Professionista Suivet snc

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

³Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Parma, Italia.

Parole chiave: scrofetta, seme morto, fertilità, prolificità,

Keywords: gilt, dead semen, fertility, prolificacy

Riassunto

Lo scopo del presente lavoro, è stato quello di confrontare gli effetti dell'impiego del seme morto sulla fertilità dell'inseminazione al successivo estro ed il suo effetto sul numero dei suinetti nati totali e mummificati, in scrofette adeguatamente condizionate alla gabbia gestazione.

Nello studio sono state incluse 525 scrofette divise nei seguenti gruppi:

Gruppo I (n=423): scrofette inseminate al momento dell'estro e messe subito nella gabbia gestazione.

Gruppo II (n=56): scrofette messe in gabbia gestazione al rilevamento dell'estro, non inseminate subito, ma inseminate con seme vivo al ciclo estrale successivo.

Gruppo III (n=74): scrofette messe in gabbia gestazione al rilevamento dell'estro, inseminate con seme morto al primo estro, ed inseminate con seme vivo all'estro del ciclo successivo.

Il test di Cuzick per la ricerca del trend fra gruppi ordinati, indica un significativo trend positivo ($p < 0.05$) nel numero dei suinetti nati totali maggiore di 13 passando dal gruppo I al gruppo III. Questa differenza, singolarmente confrontata, fra i gruppi II e rispettivamente I e III, non risulta significativa.

Il numero dei suinetti nati totali è stato più alto per le scrofette trattate con il seme morto (gruppo III) di quanto non sia stato per il gruppo I. La differenza fra i gruppi II e rispettivamente I e III, non risulta significativa.

Per la fertilità (numero di scrofe che hanno partorito rispetto a quelle fecondate), non si sono riscontrate differenze fra i tre gruppi.

I risultati di questo studio, suggeriscono che l'inseminazione con seme morto all'estro precedente a quello servito con il seme vivo, ha un effetto positivo sul successivo numero di nati totali. Questo fatto può essere attribuito anche alla riduzione dei mummificati nel gruppo III rispetto al gruppo I.

Summary

The present study has been conducted to compare the effects of intrauterine infusion of dead boar semen on the reproductive performance at succeeding estrus and its effect of the number of piglets born and born mummify in properly gestation crate adapted gilts.

In this study 525 gilts have been utilized and the animals have been divided in three groups:

Group I (n=399): Inseminated at first heat detection and immediately located into the gestation crate (Control).

Group II (n=53): Immediately located into gestation crate at first heat detection and not yet inseminated but served with alive semen at second heat during the succeeding estrous cycle.

Group III: (n=73) immediately located into gestation crate at first heat detection and inseminated with dead semen and served with alive semen at the succeeding estrous cycle (Dead Semen treatment).

The Cuzick test for a trend across ordered groups indicate a significant positive trend ($p < 0.05$) in the number of total borne piglets grater 13 between for Groups. While, the difference, between Groups II with Group I and III respectively, individually compared, were not significant.

The number of total piglets born was higher in the gilts treated with dead semen (Group III) compared gilts of Group I (Control). There were not differences between Group II and Group I and III.

Fertility (the number of gilts inseminated that farrowed) was not different accross groups. The data of this study suggest that the treatment with dead semen at the estrous cycle before insemination has a positive effect on the following number of piglets born. This is in part due a decrease in the number of mummify piglets in Group III compared Group I.

INTRODUZIONE

La gestione della scrofetta, all'interno della contemporanea azienda suinicola, si sta sempre di più consolidando come elemento chiave per il successo dell'impresa. Effettivamente si tratta del futuro dell'azienda a già dalla sua semplice introduzione dipendono tanto la produzione quanto la stabilità sanitaria futura dell'allevamento.

È risaputo che le performance zootecniche della scrofetta al primo parto, abbiano una correlazione positiva con la produttività della scrofa, nei parti successivi (Pinilla et al., 2007) ed ecco perché gli interventi volti ad implementare migliori strategie di gestione della rimonta, porteranno ad avere aziende più performanti (Pinilla et al. 2013). In particolare questo discorso vale per la prolificità. Infatti già nel 1997, la Edwards ha dimostrato che scrofette che presentavano una maggiore prolificità al primo parto, rispetto ad altre, mantenevano questa peculiarità nel contesto di tutto il resto della loro carriera (Edwards, 1997). A questo riguardo poi, è stato dimostrato che un basso numero di suinetti nati al primo parto, ha sia un effetto dannoso sulla vita produttiva della scrofa che sarà, che una maggior incidenza di riforma, rispetto a quei riproduttori che al primo parto fanno più suinetti (Hoge et al., 2011).

Fra le molte strategie volte a migliorare la produttività della scrofetta, c'è quella di permetterle un adeguato periodo di adattamento alla gabbia gestazione, prima dell'inseminazione. Pinillia et al. hanno dimostrato che la scrofetta introdotta nelle gabbia gestazione nove giorni prima della copertura, produce circa 0.9 suinetti nati vivi in meno al parto, rispetto a quella inseminata dopo 18 giorni di adattamento alla gabbia. Il fatto è stato correlato non tanto allo stress zootecnico, quanto a quello alimentare che la nuova condizione impone all'animale (Pinilla et al. 2013).

Altra strategia, altrettanto capace di influenzare positivamente le performances zootecniche della scrofetta, è quella dell'inseminazione al secondo estro, dopo aver provveduto ad un'inseminazione con il seme morto al primo. Studi condotti in Australia (Bischof et al., 1994a), Corea (Riley, 1999), USA (Murray et al, 1986) e Filippine (Captain et al., 2006), indicano che la stimolazione con seme morto dell'utero della scrofetta, effettuata durante l'estro precedente a quello utilizzato per la regolare inseminazione, sia in grado di incrementare il numero di nati e, in alcuni studi, anche la portata la parto. Questo fatto

è da mettere in relazione all'osservazione che nella scrofa, così come per altri mammiferi, la deposizione del seme nelle vie genitali femminili, induca una serie di eventi a cascata, che portano a cambiamenti cellulari e molecolari riconducibili, per molti aspetti, alla classica risposta infiammatoria (Bischof et al., 1994; Robertson et al., 1994). Al riguardo Rozeboom et al. hanno dimostrato che, dopo l'inseminazione, il plasma seminale sopprime la migrazione dei granulociti nell'utero della scrofetta (Rozeboom et al., 1999) ed *in vitro* inibisce la chemiotassi dei neutrofili (Rozeboom et al., 2001). Già dopo alcune ore dalla deposizione del seme nell'utero, a livello di endometrio della scrofa, si osserva una infiltrazione leucocitaria (Bischof et al. 1994; Rozeboom et al., 1998). Nel topo è riportato che alcuni fattori presenti nel seme, siano in grado di attivare, da parte dell'utero, la produzione di fattori di crescita e di citochine come l'interleuchina (IL)-6 e l'IGF (Insuline-like Grow Factor) (Simmen et al., 1992; Robertson et al., 1994). In ogni caso questi lavori suggeriscono che la presenza del plasma seminale sia essenziale nel regolare la reazione immunitaria dell'utero dopo l'inseminazione. Vale comunque la pena segnalare, l'esistenza di altri studi (Bishof et al., 1994; Rozeboom et al., 1999; Lessard et al., 2003) in cui non è stato possibile confermare il ruolo del seme morto, nell'incremento della reazione immunologica dell'utero e, quindi, dell'effetto positivo di questo trattamento, sulla fertilità della scrofa. In conseguenza di ciò, è possibile affermare che a tutt'oggi, non siano ancora ben chiari i meccanismi attraverso i quali, l'impiego del seme morto, possa aumentare la fertilità e la prolificità nelle scrofette.

Lo scopo del presente lavoro, è stato quello di confrontare gli effetti dell'impiego del seme morto sulla fertilità dell'inseminazione al successivo estro e sulle sue ripercussioni sia relativamente ai nati totali che ai mummificati, il tutto confrontato con il condizionamento della scrofetta alla gabbia gestazione. Avere informazioni sui mummificati, potrebbe aiutare a capire se l'effetto positivo, indotto da questa pratica zootecnica, sia da mettere in relazione solo al meccanismo della fertilizzazione, quindi alla sopravvivenza del seme od al suo trasporto, alla sopravvivenza dell'oocita nel tratto genitale femminile, alle condizioni fisiche dell'endometrio, oppure ad un effetto positivo sulla sopravvivenza embrionale e fetale.

MATERIALI E METODI

Azienda e animali

L'azienda, è un sito uno, posto nella pianura padana, ha una consistenza numerica di circa 700 scrofe e una gestione a bande bisettimanale (10 bande) con svezzamento a 24 giorni. Si alternano quindi quattro mesi nei quali viene svezzato il giovedì e quattro mesi successivi nei quali lo svezzamento è posticipato al lunedì. L'alimentazione è automatica tanto in gestazione quanto in sala parto e si contano tre unità lavorative. Viene allevata una genetica ibrida commerciale inglese (LWxLD), con rimonta interna, realizzata tramite il solo acquisto del materiale seminale. A differenza della progenie di F1, immediatamente allontanata nei siti due, le scrofette Parentali compiono il loro ciclo produttivo all'interno delle mura aziendali in uno svezzamento ed ingrasso dedicati. Qui viene implementato un ordinario programma vaccinale contro Malattia di Aujeszky, Mal Rossino e Parvoviroso, mentre per la PRRS si realizza un condizionamento forzato verso il virus aziendale. La selezione avviene allo svezzamento (circa 7 kg) ed in prossimità dell'introduzione in stimolazione in base ai criteri standard forniti dalla compagnia genetica stessa.

Gestione del seme e suo impiego:

A differenza del seme usato per l'inseminazione fecondante, acquistato da un centro verri territoriale di fama nazionale, il seme morto, è stato ottenuto da due verri aziendali. Il loro prelievo, realizzato artificialmente da un operatore esperto, viene eseguito con cadenza bisettimanale su ciascun verro e tramite l'ausilio di una cavallina. Il seme viene raccolto in un termos previo filtraggio garantito da due garze di cotone. Viene poi pesato, valutato (microscopicamente e tramite fotocolorimetro), diluito, con un diluente commerciale preposto, e stoccato in buste da 90 ml per ottenere dosi da $2,5 \times 10^6$ spermatozoi/dose.

La neutralizzazione completa del seme viene realizzata mediante congelamento per cinque giorni consecutivi, così come da indicazioni olandesi, quindi scongelato, valutato ed immediatamente utilizzato sulle scrofette precedentemente trovate in estro.

Descrizione del trattamento

Il periodo di osservazione della prova è andato dal giugno del 2011 al marzo del 2013. Nel contesto di tale periodo non sono stati registrati eventi morbosi di particolare gravità e non sono mutati i principali elementi zootecnici quali: approvvigionamento del seme, tecnico e l'età di fecondazione delle scrofette, sempre attorno ai 240 giorni di vita e 140kg di peso vivo.

In questo studio sono state utilizzate 525 scrofette suddivise in tre gruppi così formati:

Gruppo I (n=423): scrofette inseminate al momento dell'estro e messe subito nella gabbia gestazione.

Gruppo II (n=56): scrofette messe in gabbia gestazione al rilevamento dell'estro, non inseminate subito, ma inseminate con seme vivo al ciclo estrale successivo (indicativamente 18-22 giorni dopo).

Gruppo III (n=74): scrofette messe in gabbia gestazione al rilevamento dell'estro, inseminate subito con seme morto per essere poi inseminate con seme vivo all'estro del ciclo successivo (indicativamente 18-22 giorni dopo).

Analisi Statistica

I tre trattamenti sono stati confrontati per riscontrare differenze nella fertilità (numero di scrofe rimaste gravide / numero di scrofe inseminate), numero di nati totali per scrofa, numero di feti mummificati per scrofa, probabilità di avere più di 13 nati totali per parto o probabilità di avere almeno un feto mummificato per parto.

La fertilità, la probabilità di avere più di 13 nati totali per parto e la probabilità di avere almeno un feto mummificato per parto è stata confrontata tramite test χ^2 . Il numero di nati totali e di feti mummificati per scrofa è stato confrontato tramite test ANOVA ad una via, per campioni completamente randomizzati.

L'ipotesi che esista un trend positivo nella possibilità di osservare più di 13 nati totali o un trend negativo nella possibilità di osservare almeno un feto mummificato tra i tre trattamenti è stata valutata tramite il test per il trend sviluppato da Cuzick (1985), test non parametrico estensione del test di Wilcoxon per gruppi ordinati.

In tutti i test effettuati il livello di significatività è stato posto a $p < 0.05$ ed il software statistico utilizzato è stato Intercooled Stata 7.0 (Stata Corporation, College Station, TX).

RISULTATI

I tre gruppi di trattamento non hanno mostrato differenze statisticamente significative ($p > 0.05$) in termini di fertilità (numero di animali che hanno partorito/numero di animali inseminati-tab.1)

Tabella 1: Fertilità per gruppo di trattamento: Gruppo I (n=423): scrofette inseminate al momento dell'estro e messe subito nella gabbia gestazione. Gruppo II (n=56): scrofette messe in gabbia gestazione al rilevamento dell'estro, non inseminate, ma inseminate con seme vivo al ciclo estrale successivo. Gruppo III (n=74): scrofette messe in gabbia gestazione al rilevamento dell'estro, inseminate con seme morto al primo estro, ed inseminate con seme vivo all'estro del ciclo successivo.

Table 1: fertility for each treatment group: Group I (n=399): Inseminated at first heat detection and immediately located into the gestation crate. Group II (n=53): immediately located into gestation crate at first heat detection and not yet inseminated but served with alive semen at second heat during the succeeding estrous cycle. Group III: (n=73) immediately located into gestation crate at first heat detection and inseminated with dead semen and served with alive semen at the succeeding estrous cycle.

Gruppo	Scrofa gravida	Ritorno in calore	fertilità
I	399	24	94.0%
II	53	3	94.6%
III	73	1	98.4%

Globalmente il numero medio dei nati totali e dei nati mummificati differisce tra i gruppi ($F_{2,522}=3.57$ $p < 0.05$; $F_{2,522}=6.81$ $p < 0.05$), in particolare nei confronti a due a due tra i tre trattamenti, il trattamento III ha ottenuto più nati totali e meno feti mummificati rispetto al gruppo I ($p < 0.05$), tab.2.

Tabella 2: Nati totali vivi e nati mummificati: Gruppo I: scrofette inseminate al I estro. Gruppo II: scrofette inseminate all'estro successivo, con adattamento alla gabbia. Gruppo III: scrofette inseminate con seme morto al primo estro e con seme vivo all'estro successivo.

Table 2: total born piglets and mummified piglets: Group I: Gilts first estrus inseminated. Group II: Gilts properly adapted to gestation crate and second estrus served. Group III: Gilts properly adapted to gestation crate, first estrus dead semen inseminated and served with alive semen the succeeding estrous cycle.

Gruppo	scrofette	Nati totali	Nati mummificati
I	399	12,63±3.31 ^a	0.63±1.17 ^a
II	53	13,01±3.23 ^{ab}	0.36±0.79 ^{ab}
III	73	13,66±3.18 ^b	0.16±0.47 ^b

media ±DS

a,b= i gruppi con lettere differenti hanno medie che differiscono statisticamente tra loro.

Le frequenze per i casi in cui sono stati osservati più di 13 nati totali sono riportate in tabella 3. Anche in questo confronto, esistono differenze tra gruppi nella probabilità di osservare più di 13 NT ($p < 0.05$). Nel gruppo III la probabilità di osservare più di 13 nati totali è 1.6 volte maggiore rispetto al gruppo I (Odds ratio = 1.665 CI95% 0.977-2.856, $p < 0.05$), mentre la probabilità di osservare almeno un feto mummificato per parto è 3,6 volte superiore nel gruppo I rispetto al gruppo III (Odds ratio = 3.678 CI95% 1,747-8.656, $p < 0.05$).

Tabella 3: Frequenze per i casi in cui sono stati osservati più di 13 nati totali o almeno un feto mummificato per parto. Gruppo I: scrofette inseminate al primo estro, Gruppo II: scrofette non inseminate al primo estro ma all'estro successivo, Gruppo III: scrofette inseminate con seme morto al primo estro e con seme vivo al l'estro successivo.

Table 3: frequency for the cases in which it was observed more than 13 total born piglets or at least one mummified piglet for farrowing: Group I: Gilts inseminated at first estrus. Group II: Gilts not inseminated at first estrus but inseminated at the succeeding estrus. Group III: Gilts inseminated first estrus with dead semen and inseminated with alive semen at succeeding estrous.

	Nati totali maggiori di 13		Feti mummificati	
	0 (meno di 14NT)	1 (più di 13NT)	0 (presenti)	1 (assenti)
Gruppo I	221	178 (44.8%) ^a ₈₉	136 (34.1%)	263 ^a
Gruppo II	28	25 (47.2%) ^{a,b}	12 (22.6%)	41 ^{a,b}
Gruppo III	31	42 (57.5%) ^b	9 (12.3%)	64 ^b

a,b= i gruppi con lettere differenti in apice hanno medie che differiscono statisticamente tra loro. NT=nati totali

Infine esiste un trend statisticamente significativo (test di Cuzick per la ricerca del trend fra gruppi ordinati, $p < 0.05$) di ottenere più di 13 nati totali passando dal gruppo I al gruppo II e dal gruppo II al gruppo III, questa progressiva differenza non è osservabile se si considerano le probabilità di osservare più di 11 o più di 12 nati totali. Mentre esiste un trend negativo, anch'esso statisticamente significativo ($p < 0.05$), nella probabilità di ottenere almeno un feto mummificato tra i tre gruppi, cioè le scrofette del gruppo I hanno mostrato più probabilità di quelle del gruppo II di avere almeno un feto mummificato e progressivamente queste hanno mostrato più probabilità di avere un feto mummificato rispetto al gruppo III.

DISCUSSIONE

Alla luce dei dati osservati in questo studio l'aspetto più interessante è certamente quello legato al trend statisticamente significativo ($p < 0.05$) di ottenere più di 13 nati totali e un trend significativamente negativo di avere dei parti con feti mummificati ($p < 0.05$) negli animali trattati con seme morto. Questo trend si osserva anche comparando il gruppo II con il gruppo I e III, ma la differenza non risulta statisticamente significativa. Lavori precedenti riportano, in accordo con il nostro studio, che il trattamento con seme morto al ciclo estrale precedente a quello dell'inseminazione può avere un effetto positivo sull'utero e determinare un aumento dei suinetti nati (Bischof et al., 1994a; Riley, 1999; Murray and Grifo, 1986; Captain et al., 2006). Per quanto riguarda la fertilità l'utilizzo del seme morto, relativamente al nostro studio, non ha causato delle differenze con gli altri gruppi. Quest'osservazione è in accordo con alcuni autori (Bischof et al., 1994; Rozeboom et al., 1999; Lessard et al., 2003) ma non altri (Riley, 1999; Murray and Grifo, 1986; Captain et al. 2006). Queste differenze tra studi non sono di facile spiegazione, ma nel nostro caso potrebbe essere dovuto anche alla fertilità osservata che risulta superiore al 94% in tutti i gruppi studiati.

Mediante la valutazione dei nati mummificati il nostro studio indica che una delle conseguenze positive dell'effetto dell'utilizzazione del seme morto consiste nella riduzione del numero di parti con feti mummificati.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio indicano che il trattamento con seme morto è in grado di migliorare la prolificità delle scrofette anche attraverso un meccanismo che riduce il numero dei suinetti nati mummificati. Inoltre il solo adattamento alla gabbia gestazione, rispetto a sistemi zootecnici più convenzionali di introduzione della scrofetta, non è sufficiente per ottenere un miglioramento delle performances zootecniche al parto. Per ottenere ciò è stato necessario aggiungere l'inseminazione con il seme morto durante l'estro precedente.

BIBLIOGRAFIA

Bischof, R. J., C.S. Lee, M. R. Brandon, Meeusen, E. (1994). Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 26, 131-146.

Capitan, S.S., Peñalba, F.F., Geromolou, F.B., Dalumpienes, J.M. (2006). Improved Reproductive Efficiency in Gilts by Intrauterine Infusion of Killed Boar Semen before Breeding. *Asian-Aust J Anim Sci* 19, 789-792.

Cuzick, J. (1985). A Wilcoxon-type test for trend. *Statistics in Medicine* 4, 87-90.

Edwards, S. (1997). Management of Gilts, primiparous sows, multiparous sows and boars. XVIII Symposium Anaparc. Lleida, 13 y 14 Noviembre 1997. Pp 73-85

Hoge M.D., Bates R.O. (2011). Developmental factors that influence sow longevity, *J ANIM SCI*, 89:1238-1245.

Lessard, M., Lépine, M., Matte, J.J., Palin, M.F., Laforest, J.P. (2003). Uterine immune reaction and reproductive performance of sows inseminated with extended semen and infused with pooled whole dead semen 1,2,3. *J. Anim. Sci.* 81, 2818-2825.

Murray, F. A. and A. P. Grifo, Jr. (1986). Intrauterine infusion of killed semen to increase litter size in gilts. *J. Anim. Sci.* 62:187-190.

Murray, F. A., A. P. Grifo, Jr. and C. F. Parker. (1983). Increased litter size in gilts by intrauterine infusion of seminal and sperm antigens before breeding. *J. Anim. Sci.* 56:895-900.

Pinilla, J.C., Kummer R., Piva J., Williams N.H. (2007). Key components to wean 11+ piglets per farrowing, 38th AASV meeting, Good to great, March 3-6 Orlando Florida, 215-220.

Pinilla J.C., Teuber R., Piva J., Coates J. (2013). Gilt management 2.0, 44th AASV meeting, Purpose-Inspired Practice, March 2-5 San Diego California, 133-137

Riley, J. (1999). Uterine Priming of Gilts to Increase Litter Size. Associates International, 'Warreners' MS 150, Pittsworth Qld 4356

Robertson, S. A., Seamark, R.F., Guilbert, L.J., Wegmann, R.F. (1994). The role of cytokines in gestation. *Crit. Rev. Immunol.* 14, 239-292.

Rozeboom, K. J., M. H. T. Troedsson, and B. G. Crabo. (1998). Characterization of the post-mating uterine inflammatory response in the gilt. *J. Reprod. Fertil.* 114:195–199.

Rozeboom, K. J., Troedsson, M.H.T., Molitor, T.W., Crabo, B.J. (1999). The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J. Anim. Sci.* 77, 2201–2206.

Rozeboom, K. J., Rocha-Chavez, G., Troedsson, H.T. (2001). Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows. *Reproduction* 121:567–572.

Simmen, F. A., R. C. M. Simmen, R. D. Geisert, F. Martinat-Botte, F. W. Bazer, and M. Terqui. (1992). Differential expression, during the estrous cycle and pre- and post-implantation conceptus development, of messenger ribonucleic acids encoding components of the pig uterine-like growth factor system. *Endocrinology* 130:1547–1556.

POSTERS

**RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI E FATTORI DI VIRULENZA IN
CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SUINI SOTTOSCROFA
E SVEZZAMENTO**

***ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS IN E.
COLI STRAINS ISOLATED FROM PIGLETS***

FACCINI S., ROSIGNOLI C., FRANZINI G., NIGRELLI A.D.

IZSLER Sezione diagnostica di Mantova

Antibiotico-resistenza, *E.coli*, fattori di patogenicità

Antimicrobial resistance, *E.coli*, virulence factors

Riassunto

366 ceppi di *E.coli* sono stati isolati da campioni di suini, in lattazione e svezzamento, con patologie enteriche, conferiti presso sezione IZSLER di Mantova dal 2010 al 2013. I ceppi sono stati analizzati per la presenza di geni per alcuni fattori di patogenicità (PFs): F4, F5, F6, F41, e F18, LT, STa e STb, mediante PCR multiplex. Inoltre, è stato eseguito un test di sensibilità agli antibiotici, mediante agar-diffusione, per un pannello di 19 agenti antimicrobici, appartenenti a 9 classi differenti. Il numero medio di resistenze è stato di 10.2 ± 3.5 riferito a singoli farmaci e 6.9 ± 1.6 per le classi di appartenenza. I fenotipi di resistenza più comuni sono stati: Tetraciclina (95.24%), Tiamfenicolo (94.16%), e Amoxicillina (93.14%). Gli isolati multi-resistenti (resistenti a più di 3 classi di antibiotici) rappresentavano il 96%. In particolare: il 32% era resistente a 4-6 classi di agenti antimicrobici, il 49% a 7-8 classi e il 15% a 9-10 classi. Il 51.4% dei ceppi possedeva almeno un gene per PFs. I più frequenti sono stati: STb (38.25%), LT (28.14%), STa (26.23%). La resistenza ad Apramicina è risultata più frequente nei ceppi con almeno un gene per PF. Al contrario, nei ceppi senza PFs, i resistenti ai chinoloni erano significativamente maggiori. Questi risultati mostrano la necessità d'indagini più approfondite sulle relazioni tra fattori di virulenza e antibiotico-resistenza, per far luce sui meccanismi di diffusione e indirizzare gli approcci terapeutici.

Abstract

A total of 366 *E.coli* strains were isolated from samples from diseased piglets submitted to the IZSLER diagnostic section of Mantova between 2010 and 2013. A multiplex PCR was performed for detection of some pathogenic factors: F4, F5, F6, F41, F18, LT, STa, and STb. A panel of 19 antimicrobial agents, belonging to 10 different classes, was considered for testing antibiotic sensitivity by Kirby-Bauer disk diffusion method. The mean number of resistances was 10.2 ± 3.5 in reference to single drugs, and 6.9 ± 1.6 for antimicrobial classes. Most common resistance phenotypes were against Tetracycline (95.24%), Thiamphenicol (94.16%), and Amoxicillin (93.14%). Multi-drug resistant isolates (resistant against more than 3 antimicrobial classes) were 96%. In particular 32% had resistances against 4-6 classes of antimicrobial agents, 49% against 7-8 antimicrobial classes and 15% against 9-10 classes. At least one gene for pathogenic factor was detected in 188 strains (51.4%). Most frequent were: STb (38.25%), LT (28.14%), STa (26.23%). Interestingly resistance against Apramicyn was more frequent among *E.coli* strains with at least one gene for PFs. On the contrary, in nPFs strains, the proportion of those resistant

to quinolones was significantly higher. These results highlight the importance of deeper investigations on relations between antimicrobial resistance and virulence factors to better understand their mechanism of diffusion and therapeutic approaches.

INTRODUZIONE

Escherichia coli fa parte della flora microbica commensale dell'intestino dell'uomo e degli animali. D'altra parte, ceppi patogeni di questa specie rappresentano una delle principali cause di morbilità e mortalità nel mondo (Mainil, 2013).

Diarrea neonatale, diarrea pre-svezzamento, diarrea post-svezzamento, gastroenterite emorragica, malattia degli edemi, colibacillosi sistemica sono le patologie più importanti legate a infezioni da *Escherichia coli* nei suini. Nei decenni passati, alcuni antimicrobici sono stati utilizzati come promotori della crescita dei suinetti allo svezzamento, attraverso la prevenzione delle forme cliniche e subcliniche. Le crescenti preoccupazioni per la diffusione di ceppi batterici resistenti hanno portato l'Unione Europea (UE) a vietare dal 1 gennaio 2006 l'uso di antibiotici come promotori della crescita nella produzione di suini e bestiame.

E' noto che geni per la resistenza agli antibiotici e per fattori di virulenza possono essere trasferiti orizzontalmente tra ceppi di *E.coli* e di altre specie batteriche, attraverso elementi genetici trasmissibili (Szmolka and Nagy, 2013).

Questo studio è una valutazione della resistenza antimicrobica di ceppi di *E.coli*, con e senza i geni per alcuni fattori di patogenicità, isolati da suinetti in lattazione e svezzamento, con patologie enteriche, conferiti tra il 2010 ed il 2013 presso la sezione diagnostica IZSLER di Mantova.

MATERIALI E METODI

366 ceppi di *E coli* sono stati isolati da suini in lattazione e svezzamento, conferiti alla sezione diagnostica IZSLER di Mantova tra il 2010 e il 2013. I ceppi sono stati testati per la sensibilità ad un gruppo di 19 diversi agenti antimicrobici, appartenenti a 10 classi differenti, secondo le linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Al fine dell'elaborazione dei dati, i ceppi con sensibilità intermedia sono stati calcolati insieme ai sensibili, considerandoli "non resistenti". Ceppi di *E.coli* resistenti a più di 3 diverse classi di antibiotici sono stati considerati come multi-resistenti (MDR). Una PCR multiplex (Casey and Bosworth, 2009) è stata eseguita per la rilevazione di alcuni fattori di patogenicità (PFs): 5 diverse adesine (F4, F5, F6, F41, e F18), 3 enterotossine (LT, STa, e STb). Per valutare la significatività della differenza tra le proporzioni di isolati resistenti nei ceppi con geni per PFs e in quelli senza è stato utilizzato il test chi-quadrato. Un p-value <0.05 è stato considerato come significativo.

RISULTATI

Tutti i 366 ceppi analizzati hanno mostrato resistenza ad almeno 2 antimicrobici. I fenotipi di resistenza più comuni sono stati rilevati contro Tetraciclina (95,24%), Tiamfenicolo (93,05%) e Amoxicillina (92,46%) (Tabella 1).

Classe antibiotica	Antibiotico	Ceppi	%R
Aminociclitoli	Spectinomicina	365	57,53
Aminoglicosidi	Aminosidina	327	56,57
	Apramicina	366	47,54
	Neomicina	357	70,59
	Gentamicina	366	51,64
Cefalosporine	Cefalexina	275	38,55
	Ceftiofur	361	25,14
Macrolidi	Tilmicosina	344	88,66
Penicilline	Amoxicillina	358	92,46
	Amoxicillina + Ac.Clavulanico	295	15,59
Fenicoli	Florfenicolo	274	52,92
	Tiamfenicolo	331	93,05
Polipeptidi	Colistina (polimixin E)	366	7,10
Chinoloni	Danofloxacin	275	46,18
	Enrofloxacin	366	51,37
	Flumequina	366	60,66
	Marbofloxacin	355	41,13
Sulfamidici	Trimetoprim + Sulfamidici	359	84,68
Tetraciline	Tetraciclina	357	95,24

Tabella 1. Antibiotici utilizzati e relativa percentuale di ceppi resistenti.

Table 1. Antimicrobial agents and percentages of resistant strains

Il numero medio di resistenze è risultato $10,2 \pm 3,5$ riferito a singoli farmaci e $6,9 \pm 1,6$ considerando le classi di antimicrobici. Almeno un gene per un fattore di virulenza è stato rilevato in 188 ceppi (51.4%). I più frequenti sono stati: STb (38.25%), LT (28.14%), STa (26.23%). Il 96% degli isolati si è dimostrato MDR. In particolare, il 32% apparteneva al gruppo con resistenze contro 4-6 classi di agenti antimicrobici, il 49% aveva resistenze a 7-8 classi di antimicrobici e il 15% a 9-10 classi (figura1).

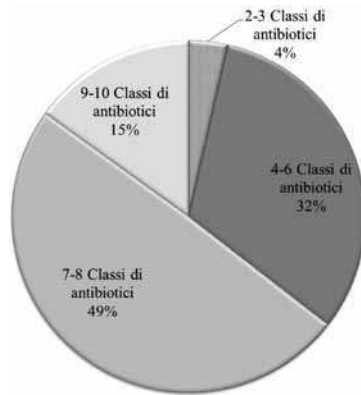


Figura 1. Suddivisione dei ceppi in base al numero di resistenze alle varie classi di antimicrobici

Figure 1. Distribution of *E.coli* strains in different groups according to the number of resistances to the antimicrobial classes

La resistenza ad Apramicina è risultata significativamente più frequente nei ceppi di *E.coli* con PFs. Al contrario, la proporzione di quelli resistenti a chinoloni era significativamente superiore in ceppi che non presentavano i FP ricercati (Tabella 2 e 3).

Antibiotico	nPFs	%R nPFs	PFs	%R PFs
Aminosidina	158	53.16	169	59.76
Amoxicillina	176	92.61	182	92.31
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	138	11.59	157	19.11
Apramicina	178	37.64	188	56.91
Cefalexina	134	40.30	141	36.88
Ceftiofur	175	27.84	186	22.58
Colistina	178	5.62	188	8.51
Danofloxacin	136	52.94	139	39.57
Enrofloxacin	178	59.55	188	43.62
Florfenicolo	136	48.53	138	57.25
Flumequina	178	69.10	188	52.66
Gentamicina	178	46.63	188	56.38
Marbofloxacin	173	47.40	182	35.16
Neomicina	174	68.97	183	72.13
Spectinomina	177	54.24	188	60.64
Tetraciclina	174	92.53	183	97.81
Tiamfenicolo	163	95.09	168	91.07
Tilmicosina	162	90.12	182	87.36
Trimetoprim + Sulfamidici	173	84.97	186	84.41

Tabella 2. Antibiotici utilizzati e relativa percentuale di ceppi resistenti (%R) nel gruppo senza i fattori di patogenicità ricercati (nPFs) e in quello con almeno un fattore rilevato.

Table 2. Antimicrobial agents and percentages of resistant strains among those without the searched pathogenic factors (nPFs) and those with at least one.

Antibiotico	R nPF	R PF	p-value
Apramicina	67/178	107/188	p < 0.01
Enrofloxacin	106/178	82/188	p < 0.01
Danofloxacin	72/136	55/139	p < 0.05
Flumequina	123/178	99/188	p < 0.01
Marbofloxacin	82/173	64/182	p < 0.05

Table 3. Proporzione di ceppi resistenti (e relativa percentuale) nel gruppo senza ed in quello con PFs (R nPF and R PF) e relativo p-value.

Table 3. Proportions of resistant strains among those without and with PFs (R nPF and R PF).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio conferma l'alta prevalenza di *E.coli* MDR nella popolazione suina (Ramos et al. 2013). Ad eccezione dell'Apramicina non sono però state riscontrate, nei ceppi con almeno un gene per PFs, resistenze più frequenti rispetto a quelli che ne erano privi. Questo dato contrasta con alcuni studi che riportano una generalizzata maggior resistenza agli antibiotici nei ceppi patogeni (Boerlin et al. 2005), ma i dati in letteratura a riguardo sono contrastanti (Da Silva and Mendonca, 2012). Al contrario, nei ceppi nPFs, la proporzione di quelli resistenti ai chinoloni è risultata significativamente più alta. Pur essendo da molti condiviso il legame tra resistenza ai chinoloni e riduzione della virulenza, i dati in letteratura, anche a questo riguardo, presentano contraddizioni e il meccanismo alla base del fenomeno è lontano dall'essere compreso (Da Silva and Mendonca, 2012).

I risultati ottenuti mostrano l'importanza d'indagini più approfondite sulle relazioni tra fattori di virulenza e antibiotico-resistenza, per far luce sui meccanismi di diffusione e supportare un utilizzo ragionato delle molecole antimicrobiche in campo.

BIBLIOGRAFIA

Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S.A., Friendship, R., Archambault, M. (2005) Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6753-6761.

Casey, T.A., Bosworth, B.T. (2009) Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 25-30.

Da Silva, G.J., Mendonca, N. (2012) Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* 3, 18-28.

Mainil, J. (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 2-12.

Ramos, S., Silva, N., Canica, M., Capelo-Martinez, J.L., Brito, F., Igrejas, G., Poeta, P. (2013) High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. *J. Sci. Food Agric.* 93, 517-526.

Szmulka, A., Nagy, B. (2013) Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front. Microbiol.* 4, 258.

**INFLUENZA SUINA: PROFILI SIEROLOGICI IN ANIMALI
VACCINATI DI ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA**

***SWINE INFLUENZA: SEROLOGICAL RESPONSES IN VACCINATED
PIGS IN ITALIAN HERDS***

FONI E.¹, ARIOLI E.², BONGIOVANNI E.², BRESAOLA M.³, CODATO A.²,
DONNA R.², FACCENDA M.⁴, FRUTTERO F.⁴, GAMBA F.², GIORGIUTTI M.⁵,
SALVINI F.², ZIZIOLI B.², LEOTTI G.⁶, MERDY O.⁷, VILA T.⁷,
JOISEL F.⁷, OSTANELLO F.⁸

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna,
sezione di Parma, Italy;*

²*Veterinario libero professionista, Lombardia, Italy;*

³*Veneto, Italy;*

⁴*Piemonte, Italy;*

⁵*Friuli V.G., Italy;*

⁶*MERIAL SpA, Milano, Italy;*

⁷*MERIAL SAS, Lyon, France;*

⁸*Dip. Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy*

Parole chiave: virus influenzale suino (SIV), vaccinazione, profili sierologici

Key words: swine influenza virus (SIV), vaccination, serological responses

Riassunto

Nel corso del 2013 è stato eseguito uno studio sull'andamento temporale degli anticorpi nei confronti dei sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2 del virus dell'influenza suina (SIV) in soggetti allevati in 11 aziende e immunizzati nei confronti di SIV con un vaccino trivalente inattivato. In ciascuna azienda sono stati selezionati tre gruppi di animali: un primo gruppo è stato vaccinato a 70-90 giorni di vita, con richiamo a distanza di quattro settimane e a circa 180 giorni di vita, con un vaccino trivalente nei confronti di SIV e con un vaccino nei confronti della malattia di Aujeszky (ADV), mediante inoculazione i.m. in due punti diversi. Un secondo gruppo è stato vaccinato, con la stessa tempistica, utilizzando una miscela dei due vaccini somministrata i.m. nello stesso punto di inoculo. Il terzo gruppo di animali è stato vaccinato solo nei confronti di ADV come tutti gli altri suini presenti nell'allevamento (gruppo di controllo). È stato effettuato un prelievo ematico da tutti gli animali appartenenti ai tre gruppi prima della vaccinazione, quattro settimane dopo il richiamo, in concomitanza con il terzo intervento vaccinale a 180 giorni di vita e prima dell'invio alla macellazione. I sieri sono stati analizzati per la ricerca di anticorpi nei confronti dei sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2 mediante inibizione dell'emoagglutinazione. La vaccinazione nei confronti di SIV ha determinato un incremento significativo dei titoli anticorpali nei soggetti vaccinati rispetto a quelli di controllo. Tale differenza è stata riscontrata anche nelle aziende nelle quali è stato possibile, su base sierologica, ipotizzare la circolazione di SIV. La conferma virologica si è avuta soltanto in una azienda nella quale sono stati riscontrati evidenti sintomi respiratori. Le diverse modalità di somministrazione della vaccinazione non hanno determinato differenze significative nella risposta anticorpale.

Abstract

Serological responses of pigs vaccinated or not vaccinated with a commercial inactivated influenza vaccine containing H1N1, H3N2 and H1N2 strains, were compared in 11 farms in Northern Italy during 2013, to evaluate vaccine serological efficacy under current field conditions. In each farm two groups of 12-14 pigs were vaccinated against swine influenza virus (SIV) concomitantly to vaccination against Aujeszky Disease virus (ADV): twice before turn-to-fattening (70-90 days of age and 4 weeks later) and at 180 days of age, during fattening. One group received separated injections of the two vaccines and one group was vaccinated following dilution of the ADV vaccine dry pellet in the SIV vaccine. A third group of 12-14 pigs (controls) was also included in the study and were vaccinated only with ADV vaccine at the same dates as the other pigs of the flow. Blood samples were roughly collected at around 70-90, 130-150, 180-210 and 250 days of age (just before slaughter) for antibody titration against recent Italian SIV subtypes H1N1, H3N2, and H1N2 by inhibition of hemagglutination test. The vaccination appeared capable of inducing a significant antibody response against the SIV strains circulating in Italy. No clear difference was found in SIV antibody titers whatever the vaccination protocol.

INTRODUZIONE

I virus influenzali appartengono alla Famiglia *Orthomyxoviridae* e possiedono un genoma a RNA composto da 8 segmenti che codificano 10 proteine virali. Particolare interesse rivestono due glicoproteine: l'emoagglutinina (H) e la neuroaminidasi (N). In base alle caratteristiche di queste due proteine di superficie è possibile distinguere 17 tipi H e 9 tipi N. La particolare conformazione segmentata del genoma determina, tramite acquisizione di mutazioni puntiformi ed eventi di riassortimento di intere porzioni di genoma virale, una elevata variabilità antigenica e genetica del virus influenzale che comporta la circolazione di varianti a diffusione endemica ma anche di virus reassortanti che possono acquisire connotati di diffusione epidemica e pandemica. Il virus dell'influenza suina (SIV) è endemico nella popolazione suina mondiale e, indipendentemente dal sottotipo coinvolto, ha un ruolo primario come causa di patologia respiratoria. I focolai clinici di influenza sono frequentemente caratterizzati da un quadro respiratorio acuto, a rapida insorgenza ed evoluzione. La letalità è in genere contenuta (inferiore all'1%), ma le perdite economiche possono essere gravi in conseguenza della perdita di peso dei soggetti colpiti, della riduzione dell'incremento ponderale e del costo dei trattamenti terapeutici delle eventuali complicanze batteriche. I diversi sottotipi di SIV sono in continua evoluzione e la loro distribuzione differisce nelle diverse regioni geografiche; ciò ha importanti ripercussioni sulla diagnosi e sul controllo dell'infezione.

Nella popolazione suina europea si è stabilizzata negli anni la circolazione di SIV appartenenti ai sottotipi "avian like" H1N1, "human-like" H1N2 e "human-like" H3N2. Nei diversi Paesi europei si rilevano tuttavia differenze significative per quanto riguarda l'incidenza dei diversi sottotipi (Van Reeth et al., 2008); a decorrere dal 2009 viene monitorata la circolazione del virus pandemico H1N1 e recentemente anche dei suoi reassortanti (Brown, 2013). Nell'ambito degli allevamenti suinicoli italiani, alla stabilizzata circolazione dei sottotipi "avian like" H1N1 e "human-like" H3N2, documentata sin dai primi anni '80, si è affiancata a partire dal 1998 la circolazione del sottotipo "human-like" H1N2. Negli ultimi anni il sottotipo "human-like" H1N2, oltre che raggiungere un'incidenza superiore rispetto agli altri sottotipi, ha assunto connotati più vicini al virus influenzale umano per quanto riguarda le caratteristiche genetiche

della glicoproteina N (Foni et al., 2010, Moreno et al., 2012).

Gli strumenti per contrastare la diffusione della infezione da SIV all'interno degli allevamenti sono rappresentati da misure di profilassi diretta e indiretta. Le misure di profilassi diretta e di biosicurezza giocano un ruolo cruciale nel limitare la diffusione di SIV tuttavia, da sole, non sono in grado di prevenire efficacemente l'infezione (Andreasen et al., 2000). La vaccinazione rappresenta quindi lo strumento di profilassi indiretta più efficace per ridurre l'incidenza della patologia. Attualmente sono disponibili commercialmente vaccini a virus intero inattivato e addizionati di adiuvante; per il loro allestimento vengono utilizzati i soli sottotipi H1N1 e H3N2 di SIV o, nel caso dei vaccini trivalenti, anche il sottotipo H1N2. Vaccini a base di proteine ricombinanti, vaccini attenuati e vaccini a DNA, pur essendo stati sperimentati, non sono ad oggi mai stati commercializzati.

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la valutazione, in condizioni di campo, della risposta sierologica nei confronti dei sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2 del virus influenzale in soggetti sottoposti a trattamento vaccinale con vaccino inattivato trivalente.

MATERIALI E METODI

Selezione degli allevamenti e degli animali

La valutazione è stata condotta in 11 aziende del nord Italia (9 a ciclo chiuso con strutture multi-sito e una a ciclo chiuso in unico sito, con un numero di scrofe compreso tra 300 e 1000; un allevamento che ingrassa suini da ristallo provenienti dalla Danimarca). In precedenza, in nessun allevamento erano in atto piani vaccinali contro l'influenza nei suini destinati all'ingrasso. In ciascuna azienda sono stati selezionati in modo casuale 36-40 suini destinati all'ingrasso di età compresa tra le 10 e 14 settimane di vita. All'interno di ciascun allevamento, gli animali selezionati sono stati identificati individualmente mediante l'applicazione di marche auricolari e distribuiti in 3 gruppi (A, B, C) di pari numerosità stabulati nei medesimi ambienti.

Vaccinazioni

I soggetti del gruppo A (gruppo di controllo) sono stati vaccinati i.m., a circa 70-90 giorni di vita con un vaccino vivo-attenuato contro la malattia di Aujeszky (AKIPOR®, Merial, Lione, Francia); le vaccinazioni successive sono state effettuate dopo 4 settimane dal primo intervento e a circa 6-7 mesi di vita.

I suini del gruppo B sono stati inoculati i.m., a circa 70-90 giorni di vita, con lo stesso vaccino contro la malattia di Aujeszky utilizzato per il gruppo A e con un vaccino nei confronti di SIV (GRIPOVAC® 3, Merial, Lione, Francia); le vaccinazioni successive sono state effettuate dopo 4 settimane dal primo intervento e a circa 6-7 mesi di vita. I vaccini sono stati somministrati in due diversi punti di inoculo, rispettivamente nella fossetta retroauricolare destra e sinistra.

Gli animali del gruppo C sono stati immunizzati con le stesse tempistiche previste per gli altri due gruppi, utilizzando un inoculo i.m. da 2 ml ottenuto dopo diluizione della frazione liofilizzata del vaccino contro la malattia di Aujeszky con 2 ml del vaccino nei confronti di SIV. Questa modalità di somministrazione viene frequentemente utilizzata in considerazione del progressivo ritiro dal mercato europeo di vaccini contenenti sia il virus della malattia di Aujeszky sia SIV.

Il vaccino nei confronti di SIV utilizzato, pronto all'uso, contiene 3 ceppi inattivati dei sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2 mentre il vaccino contro la malattia di Aujeszky è allestito

a partire dal ceppo vivo attenuato Bartha gE delete. Per entrambi i vaccini la posologia prevede la somministrazione i.m di 2 ml di prodotto.

Prelievi ematici e determinazione dei titoli anticorpali

Nel corso della prova sono stati previsti 4 prelievi ematici da tutti gli animali selezionati: 1° prelievo, il giorno della prima vaccinazione (t1); 2° prelievo, 4 settimane dopo la seconda vaccinazione (t2); 3° prelievo, il giorno della terza vaccinazione (t3); 4° prelievo, in fase di pre-macellazione e comunque non prima di 30 giorni dalla data presunta dell'invio al macello (t4). In 4 delle 11 aziende coinvolte non è stato possibile effettuare il 4° prelievo ematico previsto dal protocollo di prova. Complessivamente sono stati esaminati 1369 sieri. Sui sieri prelevati è stata eseguita la determinazione dei titoli anticorpali nei confronti dei sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2 di SIV utilizzando come antigeni stipiti di recente isolamento: H1N1 A/sw/It/267505/10, H3N2 A/sw/It/312583/09 e H1N2 A/sw/It/284922/09. Per la diagnosi sierologica è stata utilizzata l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) (OIE, 2012). I sieri sono stati considerati positivi nei confronti di uno specifico sottotipo quando il titolo anticorpale risultava ≥ 20 .

E' stata sospettata la circolazione aziendale di uno specifico sottotipo quando almeno 2 dei soggetti del gruppo di controllo (A) presentavano un titolo HI >20 contro quello specifico sottotipo.

Osservazione clinica

Ai veterinari aziendali è stato chiesto di monitorare clinicamente gli animali nel corso dell'intero periodo di prova e di segnalare tempestivamente il sospetto di focolai di influenza suina: in tal caso era richiesto il prelievo di campioni diagnostici e il loro invio al laboratorio (IZSLER, sez. di Parma) per gli accertamenti virologici.

Analisi statistica

L'andamento temporale dei titoli sierologici nei confronti di ciascun sottotipo è stato valutato in funzione del gruppo di appartenenza dei soggetti (A, B, C) e dello stato sanitario dell'azienda nei confronti di SIV. Ciascuna azienda è stata considerata infetta da uno specifico sottotipo quando almeno 2 dei soggetti del gruppo di controllo (A) presentavano un titolo HI >20 contro quello specifico sottotipo. Preliminarmente, è stata valutata la normalità della distribuzione campionaria dei titoli sierologici utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. Sulla base dei risultati di questo test, i successivi confronti sono stati realizzati mediante test U di Mann-Whitney o test di Kruskal-Wallis. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando SPSS 21.0, previa trasformazione logaritmica (\log_2) dei risultati sierologici.

RISULTATI

In base ai risultati degli esami sierologici dei soggetti appartenenti al gruppo di controllo (A), non vaccinati nei confronti di SIV, è possibile ritenere che ceppi appartenenti a diversi sottotipi di SIV siano circolati in tutte le aziende durante il periodo di sperimentazione.

In particolare, il sottotipo H1N1 era verosimilmente presente in 3 delle 11 aziende, H3N2 in 5 su 11 e H1N2 in 4 su 11 (tab. 1). In 10 aziende ha circolato un solo sottotipo mentre nell'azienda n. 11 erano presenti i sottotipi H1N1 e H3N2.

In una sola azienda (n. 1) è stato confermato un focolaio clinico di malattia, avvenuto all'inizio della fase di ingrasso; gli accertamenti virologici hanno permesso l'isolamento di SIV sottotipo H3N2.

Tabella 1. Sospetta circolazione dei diversi sottotipi di SIV nelle aziende esaminate; *conferma virologica

Table 1. Suspected circulation of the different subtypes of SIV in the examined herds; *virological confirmation

Azienda	Sottotipo SIV presente in azienda		
	H1N1	H3N2	H1N2
1	-	pos*	-
2	-	-	pos
3	-	-	pos
4	pos	-	-
5	-	pos	-
6	-	pos	-
7	-	-	pos
8	-	pos	-
9	pos	-	-
10	-	-	pos
11	pos	pos	-
	3/11	5/11	4/11

All'inizio dello studio (t1) nessuna differenza significativa ($p > 0,05$) è stata messa in evidenza per quanto riguarda i titoli anticorpali nei confronti di H1N1, H3N2 e H1N2 sia considerando i tre gruppi in sperimentazione (A, B, C), sia considerando la condizione sanitaria dell'azienda (circolazione o meno di uno specifico sottotipo) (fig. 1-3).

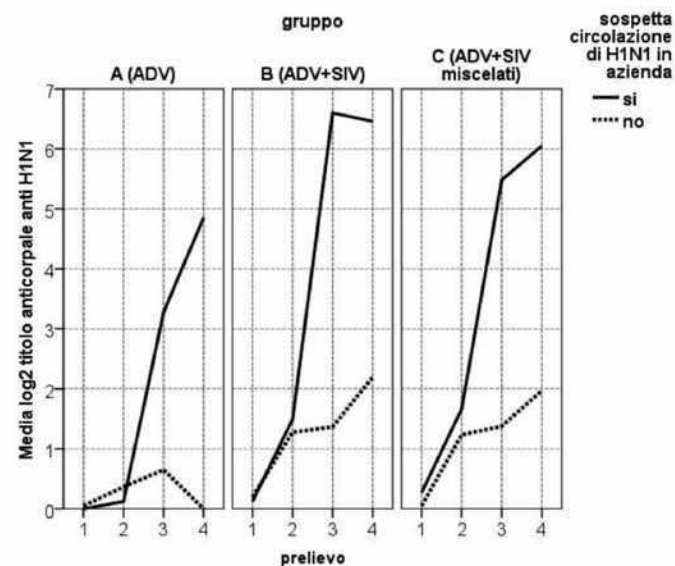
L'andamento temporale dei titoli anticorpali nei confronti di H1N1 nei 3 gruppi in sperimentazione, in funzione dello stato sanitario dell'azienda, è riportato nella fig. 1.

Al momento del secondo e terzo prelievo (t2, t3), sia nelle aziende infette, sia in quelle non infette i titoli anticorpali nei confronti del sottotipo H1N1 sono significativamente più elevati ($p < 0,05$) nei soggetti vaccinati (gruppi B o C) rispetto a quelli di controllo (A) mentre i titoli anticorpali dei gruppi vaccinati B o C non differiscono tra loro.

All'ultimo prelievo (t4), sia nelle aziende infette sia in quelle non infette, i titoli anticorpali nei confronti di H1N1 sono significativamente più elevati ($p < 0,05$) solo nei soggetti del gruppo B rispetto a quelli di controllo (A). I titoli sierologici degli animali del gruppo C sono risultati significativamente maggiori di quelli del gruppo A solo nelle aziende non infette. I titoli anticorpali dei 2 gruppi vaccinati (B o C) continuano a non differire tra loro.

Figura 1. Titoli anticorpali anti H1N1 nei tre gruppi in sperimentazione in funzione dello stato sanitario dell'azienda

Figure 1. Antibody titre kinetics against H1N1 subtypes in the 3 experimental groups, according to the health status of herds



La fig. 2 riporta l'andamento temporale dei titoli anticorpali anti H3N2 nei 3 gruppi in sperimentazione, in funzione dello stato sanitario dell'azienda.

Al momento del secondo prelievo (t2), sia nelle aziende infette, sia in quelle non infette i titoli anticorpali anti H3N2 sono significativamente più elevati ($p < 0,05$) nei soggetti vaccinati (gruppi B o C) rispetto a quelli di controllo (A) mentre i titoli anticorpali dei 2 gruppi vaccinati (B e C) non differiscono tra loro.

Questi risultati si mantengono anche al terzo e quarto prelievo (t3 e t4) nelle aziende non infette. Al contrario, nelle aziende infette, non sono state evidenziate (sia a t3 sia a t4) differenze significative tra i titoli anticorpali dei soggetti vaccinati (gruppi B o C) e quelli non vaccinati (A).

Figura 2. Titoli anticorpali anti H3N2 nei tre gruppi in sperimentazione in funzione dello stato sanitario dell'azienda

Figure 2. Antibody titre kinetics against H3N2 subtypes in the 3 experimental groups, according to the health status of herds

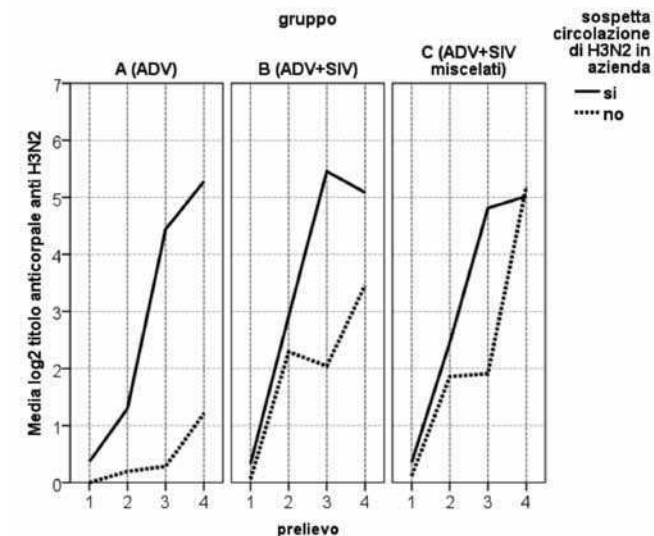
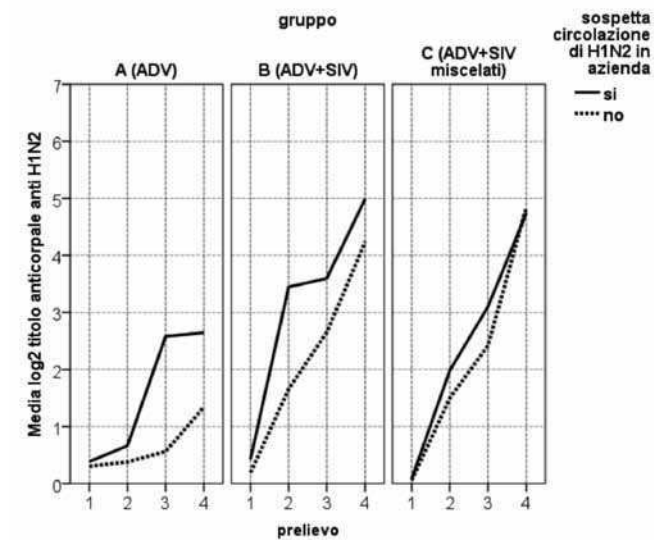


Figura 3. Titoli anticorpali anti H1N2 nei tre gruppi in sperimentazione in funzione dello stato sanitario dell'azienda

Figure 3. Antibody titre kinetics against H1N2 subtypes in the 3 experimental groups, according to the health status of herds



L'andamento temporale dei titoli anticorpali anti H1N2 nei 3 gruppi in sperimentazione, in funzione dello stato sanitario dell'azienda, è riportato nella fig. 3.

Al momento del secondo prelievo (t2), sia nelle aziende infette, sia in quelle non infette i titoli anticorpali nei confronti di H1N2 sono significativamente più elevati ($p < 0,05$) nei soggetti vaccinati (gruppi B o C) rispetto a quelli di controllo (A). I titoli anticorpali dei soggetti del gruppo B sono significativamente più elevati di quelli del gruppo C solo nelle aziende infette.

Questi risultati si mantengono anche al terzo e quarto prelievo nelle aziende non infette. Al contrario, nelle aziende infette, al terzo prelievo non sono evidenti differenze significative tra i soggetti vaccinati (gruppi B o C) e quelli non vaccinati (A) che tornano a differire significativamente al 4° prelievo. Nelle aziende infette, sia a t3 sia a t4 non sono state evidenziate differenze tra i gruppi B e C.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il virus dell'influenza suina è uno dei principali patogeni respiratori del suino ed è in grado, da solo o in associazione con altri microrganismi batterici o virali, di determinare gravi perdite economiche. La gravità delle conseguenze è inoltre direttamente proporzionale alla prevalenza di aziende infette e alla prevalenza intra-aziendale (Bennett, 2003).

I risultati del presente studio, realizzato coinvolgendo contemporaneamente un numero consistente di aziende, confermano la frequente circolazione di SIV, anche in allevamenti nei quali non vengono segnalati chiari problemi clinici che possano correlarsi all'infezione da SIV.

Con questi presupposti, la valutazione (almeno da un punto di vista sierologico) dell'efficacia della vaccinazione assume un significato importante in termini di scelta delle misure intra-aziendali di profilassi. E' stato infatti dimostrato sperimentalmente che la vaccinazione, pur non in grado di prevenire l'infezione, riduce sensibilmente le probabilità di sviluppo della malattia (Kitikoon et al., 2006) e che i titoli anticorpali HI sono direttamente correlati con la protezione nei confronti delle forme cliniche.

Nelle aziende in cui non è stata sospettata la circolazione dello specifico sottotipo, nell'intero periodo di osservazione, i soggetti non vaccinati (gruppo A) presentano titoli anticorpali anti H1N1, N3N2 o H1N2 significativamente più bassi rispetto ai soggetti vaccinati (gruppo B o gruppo C). Il lieve aumento dei titoli anticorpali che è possibile osservare nei soggetti non vaccinati verso il termine della sperimentazione (t3 e t4) potrebbe essere interpretato come la conseguenza di cross-reazioni con ceppi appartenenti ad altri sottotipi o con la circolazione a bassa prevalenza del sottotipo specifico. Questa osservazione indica che, anche in assenza di stimolazione immunitaria legata alla presenza in azienda dello specifico sottotipo, i soggetti vaccinati presentano un livello di protezione immunitaria superiore grazie anche alla cross reattività fra i sottotipi. E' stato inoltre dimostrato che la maggior parte dei vaccini induce la produzione di anticorpi neutralizzanti e quindi una parziale cross-protezione anche nei confronti dell'infezione sostenuta dal ceppo pandemico (H1N1) 2009 (Durrwald, 2010).

Nelle aziende considerate infette da H1N1 e H1N2 è stato osservato un comportamento simile, con titoli anticorpali inferiori nei soggetti non vaccinati rispetto a quelli vaccinati. Al contrario, nelle aziende con infezione da H3N2, il profilo sierologico degli animali vaccinati e non vaccinati è molto simile (fig. 2). Nel corso degli anni è stato osservato che il virus H3N2 induce in genere una risposta anticorpale più elevata rispetto a quella di altri sottotipi, sia nei soggetti vaccinati sia in quelli che sono stati infettati. Altra spiegazione della similitudine osservata tra i profili sierologici per H3N2 degli animali

vaccinati e di quelli non vaccinati potrebbe essere una più alta vicinanza antigenica tra il ceppo usato come antigene nel test di HI e i ceppi circolanti: H3N2 è infatti il sottotipo che si è modificato meno negli anni.

Per quanto riguarda le diverse modalità di somministrazione del vaccino nei confronti di SIV (inoculazione separata nel gruppo B oppure miscela dei 2 vaccini e inoculazione in un unico punto nel gruppo C) è stata messa in evidenza una sostanziale equivalenza dei titoli HI nelle aziende con e senza circolazione del sottotipo H1N2 in tutti i prelievi (fig. 3) e, per quanto riguarda H3N2 fino al terzo prelievo (fig. 2).

Nel caso del sottotipo H1N1 (fig. 1) la risposta anticorpale nei due gruppi di soggetti vaccinati è simile; tuttavia, risulta sensibilmente inferiore (per entrambe le tipologie di somministrazione) nelle aziende senza circolazione virale.

Complessivamente, dai risultati ottenuti emerge l'efficacia, in termini di stimolazione della risposta immunitaria evidenziabile con il test HI, del vaccino nei confronti di SIV considerato. Nelle condizioni in cui l'infezione non è stata sospettata, la risposta anticorpale dei soggetti vaccinati (di entrambi i gruppi B e C) è sempre significativamente superiore rispetto a quella dei soggetti non vaccinati, rafforzando l'ipotesi del ruolo primario della vaccinazione nell'induzione di una immunità umorale. Inoltre nelle aziende in cui è stata ipotizzata la circolazione virale, la risposta sierologica dei soggetti vaccinati (a prescindere dalle modalità di somministrazione) tende ad essere più rapida ed intensa rispetto a quella dei soggetti non vaccinati, contribuendo così alla riduzione della circolazione virale e quindi al rischio di sviluppo di forme cliniche. Per quanto riguarda l'efficacia delle due diverse modalità di somministrazione, l'utilizzo di una miscela dei vaccini nello stesso punto di inoculo induce in genere una risposta immunitaria inferiore (anche se non significativa) rispetto alla somministrazione separata. L'utilizzo di questa pratica andrebbe quindi attentamente valutato in funzione delle specifiche condizioni di rischio di ciascuna azienda.

BIBLIOGRAFIA

Andreasen M., Nielsen J.P., Baekbo P., Willeberg P., Bøtner A. (2000). A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Prev. Vet. Med.* 45, 221-235.

Bennett R. (2003). The 'direct costs' of livestock disease: the development of a system of models for the analysis of 30 endemic livestock diseases in Great Britain. *J. Agr. Econ.* 54, 55-71.

Brown I.H. (2013). History and epidemiology of Swine Influenza in Europe. *Curr. Top. Microbiol.* 370, 133-146.

Durrwald R., Krumbholz A., Baumgarte S., Schlegel M., Vahlenkamp T.W., Selbitz H.J., Wutzler P., Zell R. (2010). Swine influenza A vaccines, pandemic (H1N1) 2009 virus, and cross-reactivity. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1029-1030.

Foni E., Chiapponi C., Sozzi E., Barbieri I., Moreno A.M., Merenda M., Luppi A., Alborali L., Cordioli P. (2010). Caratterizzazione di virus influenzali circolanti nel suino negli anni 2008-2009 in Italia. In: *Atti XXXVI Meeting Annuale SIPAS 2010*, Montichiari (BS), 25-26 marzo 2010; 159-166.

Kitikoon P., Nilubol D., Erickson B.J., Janke B.H., Hoover T.C., Sornsen S.A., Thacker E.L. (2006). The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet. Immunol. Immunop.* 112, 117–128.

Moreno A., Chiapponi C., Boniotti M.B., Sozzi E., Foni E., Barbieri I., Zanoni M.G., Faccini S., Lelli D., Cordioli P. (2012). Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. *Vet. Microbiol.* 156, 265-276.

OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 7th ed. OIE, 2012. Chapter 2.8.8, Swine Influenza.

Van Reeth K., Brown I.H., Durrwald R., Foni E., Labarque G., Lenihan P., Maldonado J., Markowska-Daniel I., Pensaert M., Pospisil Z., Kochi G. (2008). Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza Other Res.* 2, 99-105.

ESPERIENZA SULL'EFFICACIA DELLA TILVALOSINA PREMIX AI FINI DEL CONTROLLO DELLA DISSENTERIA SUINA IN UN ALLEVAMENTO DA INGRASSO

EXPERIENCE ON THE EFFICACY OF TYLVALOSIN PREMIX ON THE CONTROL OF SWINE DISENTERY IN A FATTENIG FARM

LASA C., AÑÓN J.A.

Esteve veterinaria, Laboratorios Dr. Esteve S.A. Barcellona, Spagna

Parole Chiave: Dissenteria, Tilvalosina, Brachyspira, Suino

Key Words: *Disentery, Tylvalosin, Brachyspira, Swine*

Riassunto

La dissenteria suina è una malattia infettiva causata da *Brachyspira hyodysenteriae* che, in allevamenti da ingrasso, provoca gravi perdite economiche (studi recenti stimano che queste perdite siano pari a 16,5€/suino). In Spagna, per il controllo della malattia in allevamenti problematici, solitamente si utilizzano macrolidi, pleuromutiline, o lincosamidi nel mangime d'entrata all'ingrasso.

In questo studio si mostra l'efficacia di un programma strategico di controllo in un allevamento da ingrasso in grado di ospitare 3.300 animali, situato nel Nord Est della Penisola Iberica.

Il programma parte da una corretta diagnosi con isolamento e prova della sensibilità agli antibiotici e prevede successivamente una profonda revisione e miglioramento delle misure di biosicurezza dell'allevamento, unitamente ad un programma di trattamento strategico con tilvalosina in momenti diversi dell'ingrasso.

I risultati ottenuti sono ottimi, in quanto con la stessa spesa in farmaci rispetto ad ingrassi precedenti, si è ottenuto un miglioramento degli indici zootecnici dell'allevamento.

Abstract

The Swine Dysentery is an infectious disease caused by *Brachyspira hyodysenteriae* that, in fattening farms, causes serious economic losses (recent studies estimate that these losses are equal to 16.5 €/ pig).

In Spain, for the control of the disease in problematic farms, macrolides, pleuromutilins or, lincosamides are usually used in the feed at beginning of the fattening period.

This study shows the effectiveness of a strategic control program in a fattening farm accommodating 3,300 animals, located in the North East of the Iberian peninsula.

The program begins with a correct diagnosis with isolation and testing of antimicrobial susceptibility and subsequently provides a meticulous review and improvement of farm biosecurity measures , together with a strategic treatment program with tylvalosin at different phases of the fattening.

The results obtained are excellent as, with the same drugs costs of previous fattenings, an improvement of the performance indices was obtained.

INTRODUZIONE

La dissenteria suina è una malattia infettiva causata da *Brachyspira hyodysenteriae* (spirocheta Gram negativa, anaerobica, con elevata mobilità). Presenta una facile propagazione per via orofecale, ed è caratterizzata da lesioni dell'intestino crasso e diarree mucoemorragiche. Il

rischio principale è rappresentato dai suini portatori asintomatici, che eliminano il batterio. Attualmente rappresenta uno dei problemi più gravi degli allevamenti suini a livello mondiale, a causa della severità del processo acuto e alle elevate perdite indirette che provoca quando acquisisce carattere enzootico.

Studi recenti, effettuati negli USA, stimano che la perdita produttiva, in un suino all'ingrasso con dissenteria, sia di circa 16,5€/suino.

Per il controllo della malattia, gli antibiotici che si utilizzano sono i macrolidi, le lincosamidi e le pleuromutiline. L'esecuzione degli antibiogrammi è di grande importanza, poiché questo batterio possiede una grande capacità di generare resistenze agli antibiotici.

MATERIALI E METODI

DESCRIZIONE DELL'ALLEVAMENTO:

L'allevamento dove è stato realizzato il programma di controllo è un allevamento all'ingrasso che fa parte di un gruppo integrato, situato in provincia di Girona, in una zona dove la densità degli allevamenti è medio-alta.

L'allevamento può ospitare 3.300 animali, distribuiti in 6 capannoni (4 capannoni da 600 posti e 2 da 450 posti).

In ogni capannone, c'è una serie di box da 3 x 3 m, che ospitano circa 13 animali ognuno. In ogni recinto vi è una zona di circa 1 m di cemento, e 2 m di grigliato.

I dispositivi di alimentazione sono del tipo a imbuto, e forniscono alimento secco; i dispositivi per la somministrazione dell'acqua sono del tipo a scodellino.

All'ingresso dell'allevamento vi sono uno spogliatoio ed un magazzino, mentre non vi sono docce (Grafico 1).

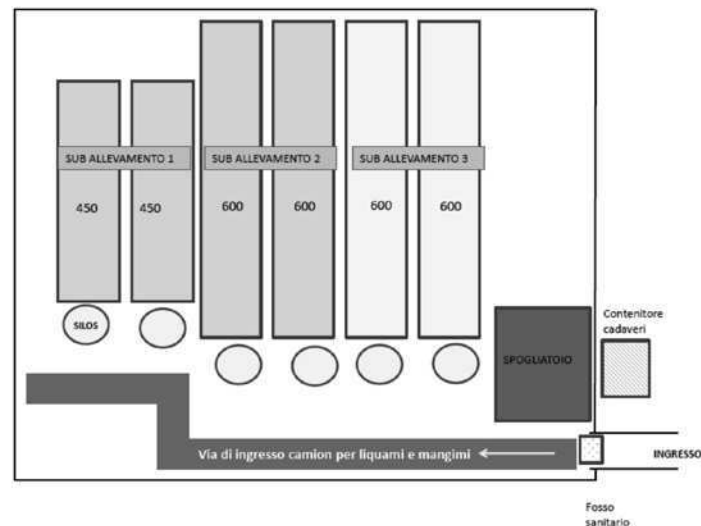


Grafico 1: Schema dell'allevamento. *Schematic representation of the fattening barns*

Gli animali entrano in allevamento a 18-20kg, vengono messi all'ingrasso fino a raggiungere un peso di 100-105 kg e poi vengono macellati.

La genetica è LDxLW, con incrocio Pietrain.

L'origine dei suinetti è sempre la stessa: due transizioni (Fase 2) che attingono indistintamente da due allevamenti di scrofe madri (Fase 1).

Nelle fasi 2 è frequente che i suinetti provenienti dagli allevamenti di scrofe si mescolino.

Storicamente, nessuno di questi allevamenti, ne' gli altri allevamenti da ingrasso che attingono da questi allevamenti, ha mai avuto episodi di dissenteria,

Tutto il mangime viene servito sfuso, sottoforma di granulato. Vengono elaborati 3 mangimi per l'ingrasso, di cui il primo è sempre un mangime "d'ingresso", contenente un trattamento preventivo.

Piano vaccinale: comprende i vaccini contro *M.hyopneumoniae* e PCV2.

L'allevamento è positivo per *Actinobacillus pleuropneumoniae* e per PRRSV.

Valutazione preliminare della biosicurezza dell'allevamento

Il perimetro dell'allevamento è recintato.

C'è un fosso sanitario, che solitamente viene tenuto asciutto affinché non si converta in un focolaio d'infezione. I liquami vengono sempre allontanati dall'allevamento con un trattore di proprietà, e vengono portati fuori dall'allevamento stesso.

I cadaveri sono allontanati dall'allevamento utilizzando un contenitore adatto all'uso.

Tutti i veicoli di carico e scarico e i veicoli che portano il mangime vengono puliti e disinfettati presso strutture esterne ma di proprietà dell'allevamento integrato.

Dopo l'uscita di ogni lotto di animali (tutto vuoto in ognuno dei 2 capannoni) si effettua un sistema di pulizia con acqua a pressione, lavaggio con detersivo, asciugatura e disinfezione con un prodotto a base di ammonio quaternario ed aldeidi.

Successivamente, i capannoni sono tenuti asciutti e vuoti per circa 5-7 giorni.

Il controllo dei roditori viene effettuato dal personale dell'allevamento, applicando veleno in siti strategici. Le finestre hanno una rete di protezione per evitare l'entrata degli uccelli.

Giustificazione del piano di controllo

L'allevamento partiva, prima del presente piano, con cifre molto sfavorevoli per quanto riguarda la resa zootecnica e la spesa farmaceutica/suino rispetto al resto degli allevamenti dell'integrazione, principalmente a causa della dissenteria.

Si è deciso di mettere in atto questo piano per cercare di tenere l'allevamento, in quanto l'altra possibilità quella di tenere l'allevamento vuoto per molto tempo, con i relativi costi economici che questo comporta.

Si sospetta che l'ingresso della patologia sia avvenuto mediante vettori provenienti da un allevamento vicino.

La dissenteria compariva normalmente in tutti i lotti dell'ingrasso, mostrando maggiore o minore gravità. Si cercava di controllarla mediante il mangime utilizzando tiamulina premix 100ppm per 10 giorni con modalità pulsatile (somministrazione al 20° giorno, al 50° e all'80° giorno dall'entrata all'ingrasso).

Dato che solitamente la patologia non veniva controllata in modo soddisfacente, si ricorreva a trattamenti aggiuntivi nell'acqua di abbeverata con lincomicina (10mg/kg PV per 10 giorni). Il risultato era la scomparsa del focolaio ma con una continua comparsa di recidive (2-3 settimane dopo): questo riduceva molto la resa degli animali, ed innalzava i costi produttivi.

Inoltre, vi era la comparsa di problema respiratori.

PIANO DI CONTROLLO MEDIANTE TRATTAMENTI STRATEGICI E BIOSICUREZZA

L'isolamento del ceppo presente nell'allevamento è stato ottenuto dalla Facoltà di Medicina Veterinaria di León, nel mese di Novembre 2011. L'antibiogramma che successivamente è stato realizzato, ha dato il seguente risultato:

Tabella 1.- Risultati da antibiogramma nel mese di Novembre 2011.
Results of the antibiograms performed in November 2011

CEPPO	H582	
PRINCIPIO ATTIVO	MIC OTTENUTA	RESISTENTE/ SENSIBILE
Tilvalosina	4	S
Lincomicina	>64	R
Tiamulina	4	S
Valnemulina	2	R
Tilosina	>128	R

Il ceppo è resistente a tilosina, lincomicina e valnemulina, mostra una sensibilità media alla tiamulina ed un'elevata sensibilità alla tilvalosina (per l'interpretazione del risultato, ci si è basati sui breakpoints indicati da Burch et al (2005).

Il risultato ottenuto è in linea con gli antibiogrammi di questo batterio, ottenuti tra il 2011 e il 2012 nella Penisola Iberica.

Dato che la molecola con il profilo di resistenza migliore è la tilvalosina (Aivlosin®), che il ceppo isolato nell'allevamento era molto sensibile alla tilvalosina ed i trattamenti con tilosina non avevano risolto il problema, si è deciso di scegliere la tilvalosina per questo protocollo di controllo:

Misure di biosicurezza:

Gli aspetti di biosicurezza da migliorare sono stati:

- Miglioramento del controllo dei roditori: sono stati eliminati i gatti e si è iniziato ad applicare un sistema di controllo, effettuato da un'azienda esterna specializzata.
- Dopo ogni svuotamento, si applica, oltre al sistema abituale di pulizia e disinfezione dei capannoni, una disinfezione aggiuntiva con soda caustica nei box (sui grigliati), a 0,75 kg/m² con l'aiuto di una pompa che eroga acqua a pressione.
- Controllo degli indumenti e degli stivali. Pulizia quotidiana delle tute da lavoro, stivali di gomma esclusivi per l'interno di ogni capannone (si installa un gancio per appenderli all'interno di ogni capannone) e pediluvio tipo vasca con disinfettante in ogni capannone.

Piani di trattamento strategici:

Il piano dei trattamenti con Aivlosin® premix è stato realizzato in questo modo:

FASE 1 (solo un lotto per capannone):

- o **Trattamento all'entrata dell'ingrasso** (18 kg PV) per 20 gg circa (26 kg di mangime/animale), a una dose di 2,125mg di tilvalosina/kg PV, equivalente a 1 kg di Aivlosin premix/Tm di mangime.
- o **3 settimane successive: nessun farmaco**
- o **Ripetizione del Trattamento** (a 50 kg di PV circa), per circa 16 gg (30 Kg. di mangime/animale) alla dose di 2 kg di Aivlosin® premix/Tm di mangime.
- o **Per le 3 settimane successive: nessun farmaco**
- o **Ripetizione del trattamento** (a 80 kg di PV aprox.), per circa 11 gg (30 Kg. di mangime/animale) ad una dose di 2 kg di Aivlosin® premix/Tm di mangime.

La Fase 1 è stata applicata solo nei sub-allevamenti 1 e 2. Nel sub-allevamento 3 la problematica era più lieve, quindi si è iniziato direttamente dalla Fase 2.

FASE 2 (eseguita in tutti i capannoni e tuttora in vigore).

- o **Trattamento all'entrata dell'ingrasso** per circa 20 gg. (26 kg di mangime/animale), a una dose di 1 kg di Aivlosin® premix/Tm di mangime.
- o **4 settimane successive: nessun farmaco**
- o **Ripetizione del trattamento** (a circa 55 kg di PV), per circa 17 gg (30 Kg. di mangime/animale) a una dose di 2 kg di Aivlosin® premix/Tm di mangime.

FASE 3:

Quando si considera opportuno, verrà mantenuto solo il trattamento all'entrata dell'ingrasso.

RISULTATI

I lotti trattati mediante questo sistema di controllo scalare hanno mostrato i seguenti miglioramenti:

- Miglioramento degli indici di conversione
- Miglioramento del costo dei farmaci/suino
- Riduzione dei giorni di ingrasso necessari per raggiungere il peso di vendita.
- Miglioramento degli *scores* delle lesioni polmonari e della sintomatologia dei processi respiratori (i risultati sono stati soddisfacenti nonostante si sia verificato in alcuni lotti il ricircolo di PRRS negli allevamenti di origine delle scrofe)
- L'allevamento è passato da risultati sotto la media del gruppo integrato a risultati superiori alla media del gruppo integrato.

TRATTAMENTO	ANIMALI ENTRATA	PESO MEDIO ENTRATA	MEDIA GIORNI INGRASSO	IPG MEDIO	PESO MEDIO	IC EGUAGLIATO da 18 A 100 KG	% DECESSI	FARMACI €/100KG
TIAMULINA	9.917	20,26	128	654	103,86	2,565	3,78	2,98
AIVLOSIN	7.526	20,28	127	127	105,45	2,443	3,33	2,77

DISCUSSIONE

- L' **IC** a 100kg di PV migliora, da 2,56Kg di mangime/kg PV fino a 2,45 negli animali trattati con Aivlosin. A 100 kg di PV, questo si traduce in un risparmio (considerando un costo medio del mangime da ingrasso di circa 0,25€/kg) di 11 kg di mangime/animale, ovvero 2,75 €/animale, considerando unicamente questa variabile. **Questi dati sono migliori rispetto alla media del gruppo integrato.**
- **I giorni medi di ingrasso** sono ridotti di un'unità. Anche se questo è difficilmente quantificabile, si potrebbe considerare che gli animali arrivano al macello **più pesanti** (1,6 kg in più), con un **IPG** superiore (17g in più) per cui questi dati assumono maggiore consistenza. **I dati ottenuti con questo trattamento migliorano la media del gruppo integrato.**
- La **% di decessi** dei lotti trattati (considerando anche i casi di meningite, che si sono verificati solo nei lotti trattati) è stata inferiore (0,45%) rispetto ai lotti trattati. Grazie a questo dato, l'allevamento mostra un tasso di mortalità **molto simile a quello del gruppo integrato.**
- In quanto al **costo dei farmaci** , esso è **stato ridotto del 7%**, tenendo conto anche dei trattamenti utilizzati per i focolai di meningite. **Questi costi sono superiori ai costi per i farmaci del gruppo integrato, ma**, come si è potuto osservare in questo allevamento problematico, **l'investimento viene ripagato se osserviamo gli altri parametri.**

CONCLUSIONI

La dissenteria è una patologia che provoca diarrea mucoemorragica nelle scrofe e nei suini da ingrasso, causando gravi perdite economiche.

Attualmente, l'antibiotico che ha dimostrato maggiore sensibilità è la tilvalosina (Aivlosin®): questo la rende idonea per un piano di controllo basato sulla riduzione della prevalenza, con trattamenti scaglionati (3-2-1).

Il risultato può essere considerato ottimale, poiché, con un investimento in farmaci simile a quello degli anni precedenti (sebbene superiore a quello degli altri allevamenti dell'integrazione) è stato ottenuto un migliore indice di conversione, un minore tasso di decessi, una minore spesa per i medicinali, e un migliore IPG rispetto agli anni precedenti, addirittura superando globalmente la media del resto del gruppo integrato.

BIBLIOGRAFIA

1. EMA (European Medicines Agency) 2010 "Summary of Product Characteristics document for Aivlosin". Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000083/WC500061063.pdf. Accessed 21 January 2014
2. Hidalgo A, Carvajal A, Vester B, Pringle M, Naharro G, Rubio P. (2011) "Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain". *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 July; 55(7): 3330–3337.
3. Burch D. (2005) "Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in the pig and breakpoint determinations". *The Pig Journal* (2005) 56, 25-44.
4. Aarestrup F, Duran O, Burch D. (2008) "Antimicrobial resistance in swine production". *Animal Health Research Reviews* 9(2); 135–148

**FOCOLAI DI INFEZIONE DA VIRUS
DELL'ENCEFALOMIOCARDITE (EMCV) IN TRE ALLEVAMENTI
DA RIPRODUZIONE APPARTENENTI ALLA STESSA AZIENDA DI
PRODUZIONE SUINICOLA**

***OUTBREAKS OF ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS (EMCV)
INFECTION IN THREE BREEDING HERDS OF THE SAME PIG
PRODUCTION FARM***

NIGRELLI A.D.¹, ROSIGNOLI C.¹, FACCINI S.¹, GAMBA F.²,
FRANZINI G.¹, SARLI G.³.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, B. Ubertini;

²Medico Veterinario Libero Professionista;

³Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna

Parole chiave: suino, virus dell'encefalomiocardite, EMCV

Key words: swine, encephalomyocarditis virus, EMCV

Riassunto.

Nel presente lavoro vengono riportati i dati relativi a focolai di mortalità improvvisa in suinetti in lattazione e aumento di nati-morti e feti mummificati al parto, comparsi contemporaneamente in tre allevamenti da riproduzione (A, B e C), appartenenti allo stessa azienda suinicola. Le tre unità produttive, due nella provincia di Mantova e una nella provincia di Brescia, erano dislocate a più di 20 Km di distanza l'una dall'altra. In un allevamento (A) la mortalità ha coinvolto anche il reparto delle scrofette da rimonta, nella fase di peso vivo compresa tra i 40 e i 70 Kg. Le indagini di laboratorio effettuate su suini e feti colpiti dalla patologia hanno evidenziato la presenza di una infezione da virus dell'encefalomiocardite (EMCV). EMCV è stato rilevato mediante RT-PCR in campioni di tessuto cardiaco delle diverse categorie di animali. La diagnosi è stata confermata dalla presenza di caratteristiche lesioni istopatologiche miocardiche. La contemporaneità dell'insorgenza dei focolai di infezione nei 3 allevamenti rende plausibile l'ipotesi di una trasmissione dell'EMCV dal sito produttivo A agli altri due (B e C) mediante il trasferimento delle scrofette da rimonta. La stima delle perdite globali causate dalle infezioni da EMCV, calcolata sullo scostamento rispetto agli indici aziendali di performance riferiti ai 4 mesi che hanno preceduto i focolai, si è attestata su 1.295 feti, 569 suinetti lattanti e 42 scrofette da rimonta. Il danno economico stimato complessivo ha superato i 76.000 euro.

Abstract.

The present work shows data related to outbreaks, characterized by sudden death in lactating piglets and increased stillbirth-rate and mummified fetuses, appeared simultaneously in three breeding herds (A, B and C) of the same production farm, placed at more than 20 Km of distance. In one herd (A), mortality involved also the replacement gilts, at 40 -70 kg of live weight. Laboratory investigations, carried out on pigs and fetuses affected by the disease, showed the presence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection. The virus has been detected by RT-PCR on samples of heart tissue of different animal categories (fetuses, piglets, gilts). The diagnosis was confirmed by the presence of characteristics

myocardial histopathological lesions. The simultaneous onset of the outbreaks of infection in all the production units makes plausible the hypothesis of a EMCV transmission from the herd A to the others (B and C) through the transfer of replacement gilts. The estimated losses due these EMCV infections outbreaks, calculated on the deviation of the performance data from those of the previous four months, amounted to 1.295 fetuses, 569 piglets and 42 replacement gilts, for an economic damage exceeding 76.000 euro.

INTRODUZIONE

Il virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è un virus a RNA, privo di envelope, appartenente al genere *Cardiovirus* della famiglia delle *Picornaviridae* (Alexandersen *et al.* 2012). Fino a poco tempo fa tutti i ceppi di EMCV, anche se a diversa virulenza, venivano classificati in un unico sierotipo. Solo recentemente è stato isolato in Germania, da un roditore (*Apodemus sylvaticus*), un ceppo virale con una configurazione antigenica tale da ritenere possibile l'esistenza di un secondo sierotipo (Phillips *et al.* 2012). EMCV venne isolato per la prima volta in Florida nel 1945 da un primate in cattività deceduto per miocardite ed edema polmonare (Helwig e Smidt 1945). Da allora ad oggi l'infezione è stata dimostrata in molte specie animali, compreso l'uomo, in diverse aree del mondo (Pope 1960, Tesh 1978). I roditori, specialmente topi e i ratti, sono considerati gli ospiti naturali e perciò i principali serbatoi dell'agente virale (Billinis 2009). Nei ratti, in particolare, il virus viene escreto con le feci e le urine anche per più settimane dopo il contagio (Spyrou *et al.* 2004).

Nella maggior parte delle specie animali, così come nell'uomo, l'infezione da EMCV è per lo più asintomatica. In questo contesto fanno eccezione il suino domestico e alcune specie animali allevate nei parchi zoologici (Canelli 2010). Nell'allevamento suino le forme cliniche di infezione da EMCV, sebbene sporadiche, quando si manifestano in forma di focolaio possono arrecare rilevanti danni economici. A partire dagli anni '90, infatti, diverse sono state le segnalazioni riguardanti episodi caratterizzati da elevati tassi di morbilità e mortalità (Knowels *et al.* 1998; Koenen *et al.* 1999; Candotti *et al.* 1997, Maurice *et al.* 2005, Sandri *et al.* 2012). Nel continente europeo, in particolare in Belgio e in Italia, sono state individuate delle "aree endemiche" nelle quali la varie forme della malattia si manifestano con una maggiore frequenza (Maurice *et al.* 2005). Nell'area endemica italiana, la pianura padana centrale, è stata riscontrata in alcuni allevamenti una prevalenza di positività sierologica negli animali anche del 60% (Maurice *et al.* 2005).

L'infezione naturale nel suino avviene per via orale. L'evoluzione verso la malattia dipende da più fattori tra cui il ceppo virale, la quantità di virus a cui è esposto l'animale e la suscettibilità di ogni singolo soggetto. Quest'ultimo aspetto è strettamente correlato con la presenza o meno di uno stato immunitario specifico nei confronti di EMCV.

Nel suino l'infezione da EMCV, quando non è asintomatica, si può manifestare in due forme principali: morte improvvisa per miocardite acuta nei soggetti giovani, specialmente nei suinetti di poche settimane di vita, e disturbi riproduttivi nella scrofa gestante (Joo 1992; Gelmetti *et al.* 2006; Christianson *et al.* 1992).

Focolai di miocardite possono colpire non solo suinetti lattanti, sicuramente i più suscettibili alla malattia, ma anche soggetti dal post-svezzamento e fino nelle fasi più avanzate dell'accrescimento (Sandri *et al.* 2012). Nei suinetti in sala-parto spesso si sviluppa una forma iperacuta con esito rapidamente letale per le gravi lesioni cardiache e il conseguente edema polmonare. A livello di nidata la mortalità può raggiungere il tasso del 100%. Nelle forme meno acute, rilevabili più spesso nei soggetti in post-svezzamento

e in accrescimento, è possibile talvolta notare alcuni segni che precedono la morte quali tremori, barcollamenti, paralisi e una forte dispnea (Joo 1992; Alexandersen *et al.* 2012). Nelle scrofe gravide l'infezione da EMCV può determinare morte fetale, specialmente nella fase tardiva della gravidanza, con aumento al parto del numero di nati- morti e di mummificati (Christianson *et al.* 1990; Dea *et al.* 1991; Kim *et al.* 1989; Koenen *et al.* 1991).

Il presente lavoro è uno studio riguardante tre importanti focolai di infezione da EMCV che hanno coinvolto, nello stesso periodo, tre allevamenti da riproduzione appartenenti alla stessa azienda di produzione suinicola.

MATERIALI E METODI

Allevamenti coinvolti

Gli episodi hanno interessato contemporaneamente tre distinti allevamenti da riproduzione (A, B, C). L'allevamento A e l'allevamento B, situati nel territorio della provincia di Mantova e distanti fra di loro circa 20 km, erano costituiti ognuno da circa 1000 scrofe. L'allevamento C, situato nella provincia di Brescia e distante circa 60 Km dagli altri due, contava circa 2500 scrofe. L'allevamento A era adibito alla produzione di scrofette da rimonta, fino ad un peso di 70-100 kg, destinate alle altre due unità produttive, l'allevamento B e l'allevamento C. I suinetti non destinati alla rimonta dell'unità produttiva A e tutti i suinetti delle unità produttive B e C, dopo aver raggiunto il peso di circa 30 Kg, venivano poi trasferiti in altri siti produttivi specifici per la fase di ingrasso. In tutte e 3 le unità produttive si utilizzava il sistema di gestione a "bande" con l'applicazione del "tutto-vuoto tutto-pieno" e sanificazione dei locali tra un ciclo e l'altro. All'interno del piano di biosicurezza di ogni allevamento erano previsti periodici interventi di derattizzazione da parte di ditte specializzate.

Prima degli episodi oggetto della presente indagine nei tre allevamenti non erano mai stati registrati eventi sanitari riferibili a infezione da EMCV. I focolai oggetto di studio si sono manifestati nei mesi di Febbraio, Marzo e Aprile 2011. La malattia ha coinvolto sia i suinetti in sala-parto (miocardite acuta) sia le scrofe in gestazione (infezione e morte fetale). Inoltre, nell'allevamento A, infezioni letali da EMCV sono state rilevate nel reparto delle scrofette da rimonta in soggetti con peso vivo compreso tra i 40 e i 70 Kg.

Indagini di laboratorio

Le carcasse dei suinetti lattanti delle 3 unità produttive, delle scrofette da rimonta di 40 – 60 kg, dei feti mummificati e dei suinetti nati morti venivano inviati alla Sezione diagnostica di Mantova dell'IZSLER per l'effettuazione di esami necroscopici ed indagini di laboratorio. Campioni di tessuti sono stati sottoposti ad esame batteriologico colturale e a ricerche virologiche mediante tecnica PCR per il virus della PRRS, per il virus della Malattia di Aujeszky, per PCV2 e per Parvovirus. Sempre mediante PCR, campioni di muscolo cardiaco sono stati esaminati per la ricerca di EMCV (Bakkaly Kassimi *et al.* 2002).

Da porzioni di tessuto miocardico di suinetti lattanti e di scrofette, fissate in formalina tamponata al 10% ed incluse in paraffina, sono state allestite sezioni per indagini istologiche mediante colorazione con ematossilina eosina.

Sei settimane dopo l'inizio dei focolai sono stati prelevati 20 campioni di sangue di scrofe, che avevano partorito durante l'episodio acuto, da ognuno dei tre siti di produzione. In

tali campioni è stata effettuata la ricerca di anticorpi anti *Leptospira* con tecnica di micro-agglutinazione lisi (MAT) e la ricerca di anticorpi anti EMCV mediante ELISA competitiva, quest'ultima sviluppata dal reparto di biotecnologie diagnostiche dell'IZSLER e basata sull'impiego di specifici anticorpi monoclonali.

Raccolta ed elaborazione dei dati

I dati di performance delle tre unità produttive sono stati recuperati dal sistema di monitoraggio e registrazione aziendale nel quale erano precisamente raccolti su base mensile: numero di parti, suinetti nati vivi per parto, suinetti nati morti per parto, feti mummificati per parto, suinetti morti in lattazione per parto, numero svezzati per parto, numero medio scrofe presenti, % aborti per scrofa presente.

Per il calcolo della stima del danno economico riconducibile ai focolai di EMCV è stato in primo luogo stimato il numero dei soggetti persi nelle diverse categorie coinvolte (feti, suinetti e scrofette) calcolando lo scostamento degli indici, relativi ai periodi nei quali si è manifestata la patologia, rispetto al loro valore medio più IC 95% nei 4 mesi precedenti l'insorgenza dei focolai. Per la trasformazione delle perdite di animali in valuta è stato applicato il valore di 35,00 € per ogni feto, di 40,00 € per ogni suinetto lattante e di 200,00 € per ogni scrofetta. Tutti i calcoli sono stati effettuati mediante l'utilizzo di MS Excel 2010.

RISULTATI

Dati clinici ed epidemiologici

Nel mese di Febbraio del 2011, contemporaneamente in tutti e tre gli allevamenti (A,B e C) si è manifestato un significativo aumento della mortalità nei suinetti in sala-parto (fig. 1). La malattia ha coinvolto soggetti di tutte le età, dalla prima alla quarta settimana. Il più delle volte i suinetti venivano trovati morti senza che avessero manifestato in precedenza alcun sintomo. Nei pochi casi in cui si notava una fase clinica, sempre comunque caratterizzata da una evoluzione molto rapida, i sintomi erano rappresentati da anoressia, tremori e dispnea. Il tasso di mortalità intra-nidiata era elevato e spesso pari al 100%. Da sottolineare il fatto che nidiate contigue a quelle colpite potevano anche non manifestare alcuna forma patologica.

In tutte e tre le unità produttive, nei due mesi successivi rispetto a quello di riscontro dell'aumento di mortalità in sala-parto, veniva rilevato un significativo aumento del tasso di nati-morti e dei mummificati rispetto ai dati medi storici dei singoli allevamenti (fig. 2). Va sottolineato che le scrofe di tutte le classi di parto erano state coinvolte in questi eventi patologici. Al di là dei problemi riproduttivi, rare erano le manifestazioni cliniche nei riproduttori. Solo in qualche caso si è manifestato un lieve rialzo febbrile e disoressia. Nel mese di Febbraio, e ancor di più nel mese di Marzo, nell'allevamento A si registravano mortalità improvvise anche nel settore delle scrofette in accrescimento, nella fase compresa tra i 40 e i 70 kg di peso vivo (fig. 3). In alcuni casi era possibile notare una fase clinica con intensa dispnea prima della morte.

In tutte le tre unità produttive, nello stesso periodo, non è stato riscontrato un aumento significativo della mortalità nella fase post-svezzamento, ovvero da 7 a 30 kg di peso vivo.

Fig. 1. Andamento del numero di suinetti morti in lattazione per parto
Fig. 1. Trend in the number of dead piglets per litter in pre-weaning period.

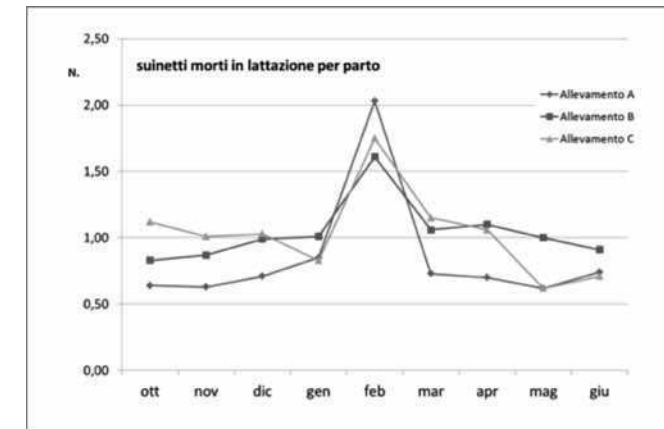


Figura 2. Andamento del numero di feti nati-morti e mummificati per parto
Figura 2. Trend in the number of stillborne and mummified fetuses per litter

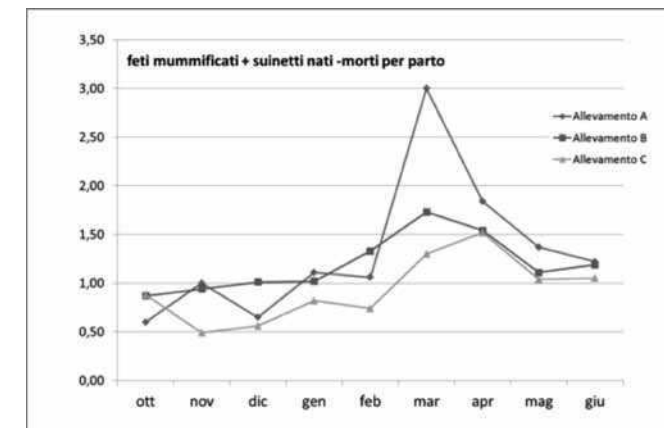
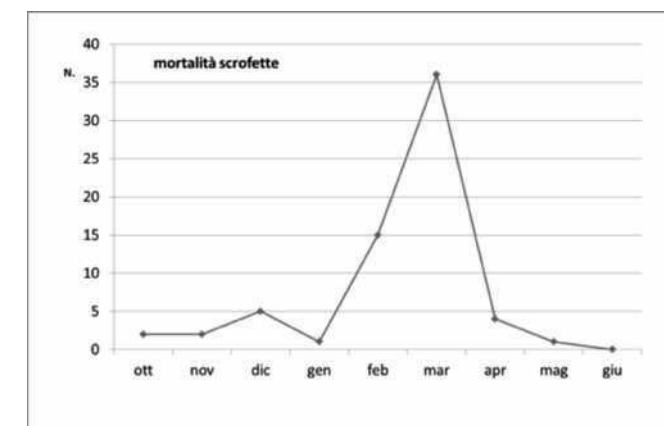


Fig.3. Andamento della percentuale di mortalità nelle scrofette nell'allevamento A.
Fig.3. Trend in the percentage of mortality in gilts in herd A.



Lesioni macroscopiche e indagini istologiche

Le carcasse dei suinetti lattanti si presentavano sempre in buono stato di nutrizione e idratazione. All'apertura della cavità addominale e toracica il quadro anatomopatologico era caratterizzato da edema polmonare con emorragie sparse nel parenchima, eccesso di liquido pleurico ed ascite (fig 4). Spesso era presente schiuma in trachea. A livello cardiaco si notava pallore generalizzato e in alcuni casi emorragie sub-epicardiche.

Nelle scrofette colpite dalla malattia era frequente osservare le caratteristiche lesioni multifocali grigio-chiare nel muscolo cardiaco ventricolare (fig 5). I feti non mostravano quadri lesionali specifici.

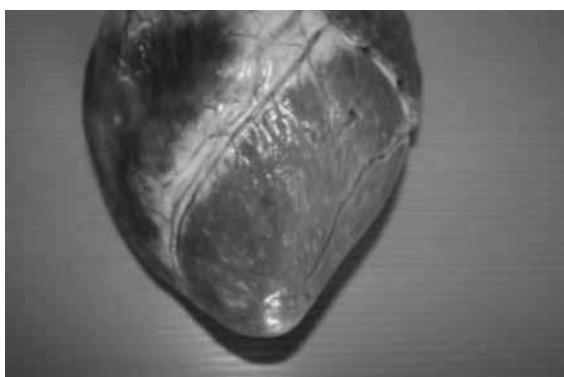
Fig. 4. Suinetto di due settimane di età con infezione da EMCV con edema polmonare e trasudato siero-emorragico in cavità toracica e addominale.

Fig. 4. Two weeks old piglet with EMCV infection showing pulmonary edema and sero-hemorrhagic transudate in thoracic and abdominal cavity



Fig. 5. Cuore di scrofetta con infezione da EMCV con tipiche lesioni multifocali

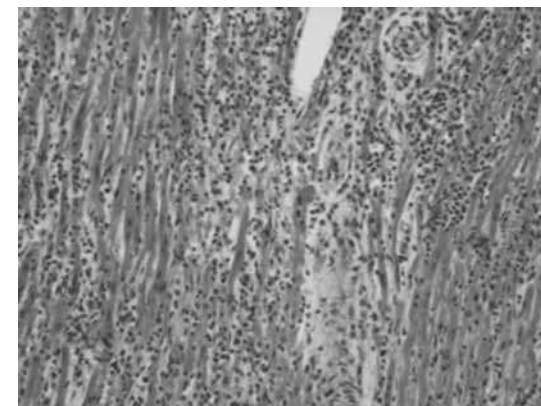
Fig. 5. Heart of gilt with EMCV infection showing typical multifocal lesions.



Dall'esame istologico dei muscoli cardiaci dei suinetti e delle scrofette veniva rilevata una miocardite interstiziale acuta multifocale grave (fig. 6).

Fig. 6 . Cuore di suinetto lattante con miocardite interstiziale (Ematossilina-eosina, 20x)

Fig. 6. Heart of suckling piglet with interstitial myocarditis (Hematoxylin-eosin, 20x)



Indagini microbiologiche colturali e biomolecolari

I test batteriologici colturali non hanno fornito risultati di valore diagnostico in tutte le tipologie di soggetti e di campioni esaminati. I test PCR effettuati per la ricerca di virus della PRRS, PCV2, Aujeszky e Parvovirus sono risultati costantemente negativi. I tessuti fetali e i cuori dei suinetti lattanti e delle scrofette esaminati per EMCV hanno sempre dato esito positivo.

Indagini sierologiche

Gli esami sierologici su campioni di siero di scrofe dei 3 allevamenti per la ricerca di anticorpi anti Leptospira sono risultati negativi. Al contrario tutti i campioni sono risultati positivi per anticorpi anti EMCV.

Stima delle perdite dovute a ECMV

Nella tabella 1 vengono riportate le stime delle perdite di soggetti delle diverse categorie interessate dalla patologia (feti, suinetti, scrofette) e le relative trasformazioni del danno in valuta (€). Nella tabella 2, sono riportate le perdite totali in valuta (€) e la loro suddivisione per il numero medio di scrofe presenti in ogni allevamento..

Tabella 1. Stima delle perdite riconducibili a infezione da EMCV suddivise per allevamento e categoria di suini coinvolti.

Tabella 1. Estimate of losses due to infection with EMCV subdivided by category of swine involved.

ALLEVAMENTO	perdite per nati-morti e mummificati			perdite per mortalità nei suinetti lattanti			perdite per mortalità nelle scrofette 40-70 Kg p.v.		
	numero	costo unitario (€)	totale (€)	numero	costo unitario (€)	totale (€)	numero	costo unitario (€)	totale (€)
A	506	35,00	17.710,00	177	40,00	7.080,00	42	200,00	8.400,00
B	611	35,00	21.385,00	305	40,00	12.200,00			
C	178	35,00	6.230,00	87	40,00	3.480,00			
Tot.	1295		45.325,00	569		22.760,00	42		8.400,00

Tabella 2. Stima delle perdite riconducibili a infezione da EMCV suddivise per il numero medio di scrofe presenti nei tre allevamenti.

Tabella 2. Estimate of losses due to infection with EMCV subdivided by the average number of breeding sows present in the three herds.

ALLEVAMENTO	totale perdite (€)	numero medio scrofe presenti	totale perdite per scrofa (€)
A	33.190,00	1083	30,65
B	33.585,00	2567	13,08
C	9.710,00	992	9,79
Tot.	76.485,00		

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro sono stati indagati episodi di mortalità improvvisa nei suinetti in lattazione e problemi riproduttivi nelle scrofe (morte fetale) comparsi contemporaneamente in tre allevamenti appartenenti allo stessa azienda di produzione suinicola. In uno dei tre allevamenti la mortalità ha coinvolto anche il reparto delle scrofette da rimonta, nella fase di peso vivo compresa tra i 40 e i 70 Kg. Le indagini di laboratorio effettuate su animali e feti colpiti dalla patologia hanno individuato la presenza di una infezione da EMCV. Il virus è stato evidenziato mediante RT-PCR. I riscontri delle caratteristiche lesioni istopatologiche miocardiche hanno confermato la diagnosi emersa dai test biomolecolari.

Il sospetto di infezione da EMCV deve essere sempre tenuto in considerazione sia in caso di mortalità improvvisa dei suini lattanti (come anche in suini in post-svezzamento e in accrescimento) e sia in caso di incremento dei nati-morti e mummificati al parto, specialmente quando tali perdite fetali si manifestano nelle scrofe di diverse classi di età e non solo nelle primipare. All'esame anatomopatologico il rilievo delle caratteristiche lesioni cardiache, quando presenti, può rafforzare il sospetto clinico di infezione da EMCV. Per una diagnosi eziologica definitiva è però d'obbligo la dimostrazione della presenza del virus nei tessuti mediante specifici test quali la PCR, l'immunoistochimica o l'isolamento virale su monostrati cellulari. Tali approfondimenti diagnostici risultano ancora più indicati nelle forme che colpiscono i suinetti neonati, dove spesso non si notano lesioni macroscopiche multifocali al miocardio, o in presenza di feti nati-morti o mummificati. Nei feti può essere utile anche la ricerca degli anticorpi nei liquidi toracici (Kim *et al.* 1991; Joo 1988).

Diversi lavori hanno dimostrato che i roditori, in particolare i ratti, possono svolgere la funzione di serbatoio di EMCV e contribuire all'entrata e alla diffusione del virus negli allevamenti suinicoli. In questi animali l'infezione è spesso asintomatica e l'eliminazione dell'EMCV può persistere per diversi giorni o settimane (Spyrou *et al.* 2004). Gli alimenti contaminati da feci e urine di roditori sono considerati un'importante fonte di infezione (Alexandersen *et al.* 2012).

Un aspetto epidemiologico importante, probabilmente alla base della spiegazione del perché i focolai si sono manifestati tutti nello stesso periodo nelle tre diverse unità produttive, sta nel fatto che dall'allevamento A, con frequenza tri-settimanale, venivano trasferite delle scrofette da rimonta negli allevamenti B e C. E' possibile che l'infezione sia entrata in via prioritaria nell'allevamento A e che poi un lotto di scrofette abbia veicolato il virus nelle altre

due unità produttive. La trasmissione del virus da parte del suino ad altri suini non è così efficiente come quella operata dai roditori, ma è comunque possibile ed è stata dimostrata con prove sperimentali (Foni *et al.* 1993, Maurice *et al.* 2002).

La notevole incidenza di casi di mortalità dei suinetti in sala-parto e di problemi riproduttivi nelle scrofe gestanti registrati negli episodi indagati può ritrovare una spiegazione nella elevata recettività dei soggetti colpiti dovuta, probabilmente, all'assenza di difese immunitarie specifiche nei confronti dell'EMCV.

La perdita economica stimata riconducibile ai tre focolai di encefalomiocardite è stata di circa 76.000 euro. Va sottolineato il dato che i danni più ingenti sono risultati quelli relativi ai problemi riproduttivi (59% del danno totale) meno evidenti, da un punto di vista clinico, rispetto alle morti nei suinetti e nelle scrofette (41% del danno totale) ma più diffusi e maggiormente persistenti nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

- Alexandersen S., Knowels N.J., Dekker A., Belsham J.G., Zhang Z., Koenen F. (2012) Picornaviruses. In Diseases of Swine 10th edition, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, Usa, pp. 587-620.
- Bakkali Kassimi L., Gonzague M., Boutrouille A., Cruciere C. (2002). Detection of Encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and one-step RT PCR. J. Virol. Methods, 101:197-206.
- Billinis C. (2009) Encephalomyocarditis Virus Infection in Wildlife Species in Greece. Journal of Wildlife Diseases, 45(2): 522-526.
- Candotti, Carra, E., De Simone, F. and Brocchi, E. (1997). Clinical, anatomopathological and epidemiological studies, isolation and antigenic characterization of the virus in a severe encephalomyocarditis outbreak. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Verona, Italy, 1997, p. 305-319
- Canelli E., Luppi A., Lavazza A., Lelli D., Sozzi E., Martin A.M., Gelmetti D., Pascotto E., Sandri C., Magnone W., Cordioli P. (2010): Encephalomyocarditis virus infection in an Italian zoo. Virol J. 7:64.
- Christianson, W.T., Kim, H.S., Joo, H.S. and Barnes, D.M. (1990). Reproductive and neonatal losses associated with possible encephalomyocarditis virus infection in pigs. Vet. Rec. 126: 54-57.
- Christianson, W.T., Kim, H.S., Yoon, I.J. and Joo, H.S. (1992). Transplacental infection of porcine fetuses following experimental challenge inoculation with encephalomyocarditis virus. Am. J. vet. Res. 53: 44-47.
- Dea, S.A., Bilodeau, R. and Martineau, G.P. (1991). Isolation of encephalomyocarditis virus among stillborn and post-weaning pigs in Quebec. Archives of Virology 117: 121-128.
- Foni, E., Barigazzi, G., Sidoli, L., Marcato, P.S., Sarli, G., Salda, L. and Della Spinaci, M. (1993). Experimental encephalomyocarditis virus infection in pigs. Journal of Veterinary Medicine Series B 40 (5): 347-352
- Gelmetti D., Meroni A., Brocchi E., Koenen F., Cammarata G. (2006). Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis. Vet Res. 2006 Jan-Feb;37(1):15-23
- Helwig, F.C. and Schmidt, E.C.H. (1945). A filter-passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. Science 102: 31-33.

12. Kim, H.S., Joo, H.S. and Bergeland, M.E. (1989). Serologic, virologic and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 101-104.
13. Kim, H.S., Joo, H.S., Christianson, W.T. and Morrison, R.B. (1991). Evaluation of serologic methods for the detection of antibodies to encephalomyocarditis virus in swine fetal thoracic fluids. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 283-286.
14. Knowles, N.J., Dickinson, N.D., Wilsden, G., Carra, E., Brocchi, E. and De Simone, F. (1998). Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy. *Virus Research* 57: 53-62.
15. Koenen, F., De Clercq, K. and Strobbe, R. (1991). Isolation of encephalomyocarditis virus in the offspring of swine with reproductive failure in Belgium. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 60: 113-115.
16. Koenen F., Vanderhallen H., Castryck F., Miry C. (1999). Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent encephalomyocarditis outbreaks in Belgium. *Zentralbl. Vet. Med.* 46: 217-231.
17. Joo, H.S., Kim, H.S. and Leman A.D. (1988). Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. *Arch. Virol.* 100: 131-134.
18. Joo, H.S. (1992). Encephalomyocarditis virus. In: *Diseases of Swine*, 7th edition. Ed. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire and D.J. Taylor. Chapter 17. Wolfe Publishing. pp.257-262.
19. Maurice, H., Nielen, M., Stegeman, J.A., Vanderhallen, H. and Koenen, F. (2002). Transmission of encephalomyocarditis virus (EMCV) among pigs experimentally quantified. *Veterinary Microbiology* 88: 301-314.
20. Maurice H., Nielen M., Brocchi E., Nowotny N., Bakkali Kassimi L., Billinis C., Loukaidis P., O'Hara R.S., Koenen F. (2005). The occurrence of encephalomyocarditis virus (EMCV) in European pigs from 1990 to 2001. *Epidemiol Infect* 133: 547-557.
21. Philipps, A., Dauber, M., Groth, M., Schirrmeier, H., Platzer, M., Krumbholz, A., Wutzler, P. and Zell, R. (2012). Isolation and molecular characterization of a second serotype of the encephalomyocarditis virus. *Vet. Microbiol.* 161: 49-57.
22. Pope, J.H. and Scott, W. (1960). A survey for antibodies to encephalomyocarditis virus in man and animals. *Aust. J. exp. Biol.* 38: 447-450.
23. Sandri G.P., Alborali G.L., Corradi A., Cantoni A.M., Giovanardi D. (2012) An unusually severe case of encephalomyocarditis virus (EMCV) in nursery pig. XXII Proceedings of IPVS Korea, p. 1014.
24. Spyrou V., Maurice H., Billinis C., Papanastassopoulos M, Psalla D., Nielen M., Koenen F., Papadopoulos O. (2004) Transmission and pathogenicity of encephalomyocarditis virus (EMCV) among rats. *Vet. Res.* 35: 113-122.
25. Tesh, R.B. (1978). The prevalence of encephalomyocarditis virus neutralizing antibodies among human populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 144-149.
26. Vanderhallen, H. and Koenen, F. (1997). Rapid diagnosis of encephalomyocarditis virus infections in pigs using a reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 66: 83-89
27. Zimmerman J., Schwartz K., Hill H.T., Meetz M.C., Simonson R., Carlson J.H. (1993) Influence of dose and route on transmission of encephalomyocarditis virus in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 317-321.

VALUTAZIONE COMPARATIVA IN CAMPO DI DUE CHINOLONI NEL TRATTAMENTO DELLE BATTERIOSI RESPIRATORIE ACUTE DEL CICLO MAGRONAGGIO-INGRASSO DEL SUINO

FIELD COMPARATIVE EVALUATION OF TWO QUINOLONES IN THE TREATMENT OF ACUTE RESPIRATORY BACTERIOSIS OF PIG FATTENING

SALA V. ⁽¹⁾, COSTA A. ⁽²⁾, DE FAVERI E. ⁽¹⁾, CAMPIOTTI G. ⁽³⁾

⁽¹⁾ *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica - Università di Milano*

⁽²⁾ *Dipartimento di Scienze veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare - Università di Milano*

⁽³⁾ *Medico Veterinario Libero Professionista*

Parole chiave: malattia respiratoria, suino, chinoloni, trattamento, costo-beneficio.

Key words: respiratory disease, swine, quinolones, treatment, cost-benefit.

Riassunto. La malattia respiratoria è ancora un problema rilevante in suinicoltura, ancora aggravato dalla crisi economica del settore; in Italia, la maggior durata del ciclo aumenta l'impatto produttivo della malattia. La medicazione strategica non è una soluzione praticabile per i costi eccessivi e la terapia individuale è divenuta l'unica soluzione. Tuttavia, si pone il problema della valutazione dell'efficacia e dei benefici rispetto ai costi. Sono state messe a confronto due preparazioni a base di chinoloni (marbofloxacin 4% ed enrofloxacin 5%) nel trattamento delle forme respiratorie acute del ciclo magronaggio-ingrasso; le manifestazioni cliniche valutate attraverso l'attribuzione di punteggi, sono state abbattimento, inappetenza, tosse e dispnea.

I risultati sono stati valutati mediante analisi statistica. Marbofloxacin 4% è stata più efficace, con la regressione di abbattimento e inappetenza e la limitazione dei mancati incrementi ponderali; la riduzione del danno economico ha permesso evidenti benefici ottenuti rispetto ai costi del trattamento.

Anche il confronto clinico ha dato risultati analoghi, con regressione dei sintomi, recupero funzionale, della vitalità e della crescita; inoltre, il minor dosaggio ha ridotto il costo del trattamento. Infine, il tempo di sospensione è di 6 giorni, a fronte di 10 giorni per il prodotto di confronto.

Summary. The respiratory disease is a major problem in pig farming, still aggravated by the economic crisis. In Italy, the longer duration of the production cycle increases the impact of the disease. The strategic medication is not a viable solution because of the excessive costs and individual therapy has become the only solution. However, there is the problem of the evaluation of the effectiveness and benefits than costs. We have compared two quinolones (marbofloxacin 4% and enrofloxacin 5%) in the treatment of acute respiratory disease of growing-finishing cycle. Clinical symptoms have been assessed by assigning scores to killing, lack of appetite, coughing and dyspnea. The results were evaluated by statistical analysis. Marbofloxacin 4% was most effective, with the regression of weakness and loss of appetite and limitation for weight loss. The reduction of economic damage has allowed obvious economic benefits compared to the costs of treatment. Although the clinical

comparison gave similar results, with regression of the symptoms, functional recovery, better vitality and growth. In addition the lower dosage has reduced the cost of treatment. Finally, the suspension time is 6 days, compared with 10 days for the competitor.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento intensivo del suino, la malattia respiratoria è il risultato di un complesso di eventi, nel quale un determinato agente patogeno o un qualsiasi fattore ambientale, agiscono aumentando prevalenza o incidenza dei casi clinici. Le possibilità che un'infezione si diffonda per via aerogena, dipendono dalla capacità dell'agente responsabile di mantenersi vitale nell'aria e dalla sua capacità di raggiungere concentrazioni tali da garantire una localizzazione patogena efficace nell'ospite bersaglio e quindi una forma clinica di malattia (Done & White, 2003; Sala & De Faveri, 2013).

Tutti i fattori agiscono in misura variabile, perché i meccanismi d'interazione sono strettamente dipendenti dalla natura del microrganismo; per di più, i dati al riguardo disponibili risentono della diversità dei metodi sperimentali impiegati. Da qui derivano le difficoltà riscontrate nella messa a punto di linee guida per la prevenzione delle diverse infezioni (Sala & Gusmara, 1999).

La malattia respiratoria continua a essere il principale problema sanitario nell'allevamento del suino e le sue ripercussioni economiche si sono dilatate in coincidenza con la crisi che ha colpito il settore negli ultimi anni (Losinger, 2005); nel sistema produttivo italiano, la maggior durata del ciclo produttivo accresce le difficoltà e, nelle situazioni di minore redditività, la misura correttiva più frequente è il semplice contenimento della spesa, molte volte deciso senza un'analisi appropriata dell'esistente e perciò destinato a determinare un peggioramento nel sistema produttivo dell'azienda (Giacomelli & Laniado, 1988).

Di fatto, si stabilisce una "meccanica perversa", che esercita i suoi effetti deleteri soprattutto sulla gestione sanitaria, nella quale, in forza della ridotta disponibilità economica, si preferisce il risparmio immediato alla stabilizzazione, formalmente costosa, del beneficio nel tempo.

Purtroppo, in queste decisioni non si è tenuto conto che un risparmio "irrazionale", sotto forma di una riduzione "tout court" della spesa sanitaria, può provocare, nel medio-lungo periodo, una modificazione nell'epidemiologia aziendale delle infezioni, con una selezione "di potenziamento" dei patogeni già presenti e una maggior recettività degli animali a quelli che più facilmente possono entrare in azienda; il risultato, a distanza di tempo, è il progressivo aumento delle forme cliniche, cui conseguono mortalità, perdite produttive e maggiori spese (Sala et al., 1996).

A questo proposito, giova ricordare che, nel maiale da carne, un volume di parenchima polmonare leso pari al 10% del totale, può ridurre l'incremento ponderale di 41,1 grammi per giorno e prolungare di 16,7 giorni il tempo necessario per raggiungere il peso di macellazione (Pointon et al., 1985).

In questo tipo di situazioni, il ricorso alla terapia iniettiva individuale è così aumentato rispetto alla medicazione di massa, soprattutto se questa è difficilmente attuabile per motivi manageriali (es.: numero ridotto di gruppi da trattare, e impossibilità di usare gli impianti solo per questi) o per ragioni economiche (es.: bassa incidenza di complicanze batteriche); in molti altri casi, diventa insostituibile complemento di quella orale nel trattamento dei soggetti refrattari alla medicazione *per os* e/o delle recidive (Sala et al., 1996, 2004).

Allo stato delle cose, la valutazione degli interventi non può basarsi soltanto sull'efficacia clinica, ma deve tenere in buon conto anche il costo degli stessi rispetto ai benefici ottenibili e la loro maneggevolezza (tempi di sospensione) nel caso di trattamenti in condizioni d'urgenza clinica nelle fasi finali del ciclo d'ingrasso (Sala, 2011).

Su queste basi è stata condotta la sperimentazione clinica di campo di cui si riportano i risultati in questa nota; l'obiettivo proposto è stato la valutazione dell'efficacia di una preparazione a base di marbofloxacina al 4% in comparazione con una formulazione di enrofloxacina al 5%.

Materiali e metodi

Allevamenti e animali. Sono stati considerati due reparti di magronaggio, appartenenti a un allevamento a ciclo chiuso e a uno d'ingrasso, in coincidenza con la comparsa di forme respiratorie acute; le due aziende hanno anamnesi, remota e recente, per focolai di malattia respiratoria acuta polifattoriale a induzione virale e micoplasmica, complicata da irruzione di batteri opportunisti. Le diagnosi sierologiche e batteriologiche post-necroscopiche, eseguite in sede di selezione degli allevamenti in cui condurre la sperimentazione, hanno consentito di evidenziare, in entrambe le situazioni, presenza e circolazione di *Arterivirus* della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRSV) e di *M. hyopneumoniae* e di isolare *Pasteurella multocida* tipo A come principale batterio complicante. A questo proposito, ricordiamo le oggettive difficoltà che presentano le complicanze pasteurellari del complesso respiratorio, sia per l'evoluzione molto rapida, sia per le crescenti resistenze agli antibatterici più comunemente utilizzati (Amass et al., 1994; Ross, 2006).

Principi attivi sperimentati

Marbofloxacina è un antimicrobico battericida sintetico appartenente al gruppo dei fluorochinoloni che agisce mediante l'inibizione della DNA girasi. È efficace nei confronti di numerosi batteri Gram positivi (in particolare *Staphylococcus*), Gram negativi (*Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*) e Micoplasm (*Mycoplasma hyopneumoniae*).

Dopo la somministrazione intramuscolare nei suini alla dose raccomandata di 2 mg/kg p.v., è rapidamente assorbita, raggiunge la massima concentrazione plasmatica di 1,5 µg/ml in meno di un'ora e la sua biodisponibilità è quasi pari al 100%; si lega debolmente alle proteine plasmatiche (meno del 10% nei suini) e si distribuisce ampiamente in tutto l'organismo.

Nella maggior parte dei tessuti (fegato, reni, cute, polmoni, vescica, utero) raggiunge concentrazioni superiori a quelle plasmatiche; è eliminata lentamente nei suini ($t_{1/2}$ = 8-10 ore), principalmente in forma attiva nelle urine e nelle feci.

La dose giornaliera raccomandata per la formulazione sperimentata è di 0,5 ml /10 kg p.v. (pari a 2 mg di marbofloxacina /kg di peso vivo) in una singola iniezione giornaliera per via intramuscolare per 3-5 giorni consecutivi. Il tempo di sospensione è di 6 giorni.

Enrofloxacina è un fluorochinolone ad attività battericida concentrazione dipendente, che appartiene alla classe dei derivati dell'acido carbosilico e possiede attività antibatterica contro un ampio spettro di batteri Gram-negativi e Gram-positivi. Il suo meccanismo di azione è basato sull'inibizione della girasi durante la sintesi del DNA.

La dose giornaliera raccomandata per la formulazione sperimentata è pari a 0,5 ml per ogni 10 kg p.v. (pari a 2,5 mg di enrofloxacina /kg di peso vivo) ogni 24 ore, per 3-5 giorni consecutivi; ogni somministrazione garantisce l'introduzione nell'organismo di 2,5 mg di sostanza attiva per ogni kg p.v./die. Il tempo di sospensione nel suino è di 10 giorni.

Trattamenti

Sono stati trattati casi clinici di batteriosi respiratoria acuta nel periodo gennaio – aprile 2013, suddividendoli tra i due prodotti a confronto; entrambi gli antibiotici sono stati impiegati per via intramuscolare profonda nell'area retro-auricolare.

In entrambi gli allevamenti non sono state previste modifiche degli schemi di medicazione strategica in uso.

Sono stati rispettivamente trattati 62 suini con marbofloxacina 4% e 40 con enrofloxacina

5%; il peso degli animali in prova è compreso tra 50 e 160 kg/p.v. e la ripartizione dei trattamenti rispetto al principio attivo è riportata in Tabella 1.

PESO (KG)	MARBO 4%	ENRO 5%	TOTALE
50	13	8	21
60	11	0	11
70	5	7	12
80	9	8	17
90	4	0	4
100	9	7	16
110	1	0	1
120	3	4	7
130	1	0	1
140	5	6	11
TOTALE	61	40	101

Tabella 1. Numerosità e peso degli animali in prova.

Table 1. Number and weight of the tested animals.

Il criterio d'intervento è stato il rifiuto dell'alimento al momento della distribuzione (animali che, al riempimento del truogolo, restano isolati e coricati); l'inefficacia del trattamento è stata decisa in caso di permanenza dell'inappetenza in seconda giornata.

Tecniche di valutazione.

Durante il periodo dell'osservazione clinica, della durata di 7 giorni, per ogni soggetto trattato sono state considerate, conducendo i rilievi giornalieri in occasione di uno dei razionamenti, mortalità, dispnea, tosse, abbattimento e ripresa dell'alimentazione.

Per l'osservazione clinica è stato applicato il seguente schema di valutazione:

a) *Dispnea*: 0 = assente; 1 = lieve; 2 = moderata; 3 = grave.

b) *Tosse*: 0 = assente; 1 = lieve; 2 = moderata; 3 = grave.

c) *Abbattimento*: 0 = assente; 1 = lieve; 2 = moderata; 3 = grave.

d) *Inappetenza*: 0 = assente; 1 = lieve; 2 = moderata; 3 = grave.

Criteri per la valutazione dell'efficacia del trattamento.

Un parere definitivo sull'esito del trattamento è stato espresso al termine delle tre somministrazioni, valutando anche mortalità e permanenza dei sintomi respiratori.

Analisi statistica.

Lo stato sanitario dei suini è stato valutato applicando i criteri già descritti dalla comparsa dei sintomi al terzo giorno di trattamento.

I dati riguardanti lo stato di salute dei due gruppi in prova sono stati preliminarmente sottoposti a T test (Proc. TTEST, SAS9.3, 2013) per valutare eventuali differenze significative indesiderate tra i due gruppi.

L'analisi della varianza (ANOVA) è stata eseguita sui dati raccolti utilizzando il pacchetto

statistico SAS (Proc. GLM, SAS9.3, 2013) per studiare gli effetti dei due trattamenti sullo stato clinico (abbattimento, inappetenza, tosse, dispnea) e sull'efficacia terapeutica degli antibiotici (animali sani, malati e morti).

Infine, per classificare e meglio rappresentare i risultati, è stata eseguita una procedura di frequenza sui dati disponibili (Proc. FREQ SAS9.3, 2013).

RISULTATI

Nelle tabelle e nei grafici seguenti, sono stati riportati, suddivisi per giornate e per specialità utilizzata, i punteggi medi ottenuti considerando cumulativamente i due gruppi sotto trattamento; applicando il sistema di rilevazione prestabilito, i valori cumulati sono stati suddivisi per rilievo (abbattimento, inappetenza, tosse, dispnea). In ciascuna tabella è riportato, per i due trattamenti e per ogni giornata di osservazione, il valore dell'errore standard delle medie. Per completezza e precisione, è opportuno evidenziare come tutte le differenze si siano rivelate statisticamente significative; inoltre, i punteggi iniziali garantiscono l'omogeneità clinica dei gruppi di trattamento, confermata dall'assenza sistematica di differenze statisticamente significative al giorno 0 (zero).

Le medie dei punteggi riguardanti l'abbattimento sono sistematicamente più basse per marbofloxacine e la differenza si amplifica con il procedere del trattamento (Tabella 1 e Figura 1).

Abbattimento	Marbo 4%	Enro 5%
0	2,065 ± 0,10	2,150 ± 0,13
1	1,097 ± 0,10	1,850 ± 0,13
2	0,590 ± 0,11	1,027 ± 0,14
3	0,143 ± 0,07	0,412 ± 0,09

Tabella 1. Abbattimento dei suini trattati. Punteggi medi ed errore standard delle medie.

Table 1. Weakness in treated pigs. Mean scores and averages standard error.

Anche per quanto riguarda l'inappetenza, l'effetto di marbofloxacine è rapidamente migliorativo, considerando anche la media iniziale dei punteggi più elevata.

Inappetenza	Marbo 4%	Enro 5%
0	2,161 ± 0,11	2,050 ± 0,13
1	1,097 ± 0,11	1,625 ± 0,14
2	0,475 ± 0,11	0,946 ± 0,15
3	0,161 ± 0,08	0,471 ± 0,10

Tabella 2. Inappetenza nei suini trattati. Punteggi medi ed errore standard delle medie.

Table 2. Loss of appetite in treated pigs. Mean scores and averages standard error.

Nei successivi rilievi punteggiati (1[^], 2[^] e 3[^] giornata) le differenze di efficacia dei due trattamenti appaiono evidenti a favore di marbofloxacin e, come già detto, sempre statisticamente significative.

Tosse	Marbo 4%	Enro 5%
0	0,516 ± 0,12	0,725 ± 0,15
1	0,274 ± 0,09	0,725 ± 0,12
2	0,180 ± 0,08	0,579 ± 0,10
3	0,036 ± 0,04	0,278 ± 0,05

Tabella 3. Tosse nei suini trattati. Punteggi medi ed errore standard delle medie.

Table 3. Cough in treated pigs. Mean scores and averages standard error.

Prima di tutto, è opportuno osservare come la tosse non sia stata particolarmente presente nelle forme respiratorie sottoposte a trattamento e come, di conseguenza, anche la media dei punteggi dei due gruppi di prova ne abbia visibilmente risentito; anche in questa situazione, tuttavia, è apparsa evidente, sempre a livelli statisticamente significativi, la maggior efficacia terapeutica di marbofloxacin rispetto al principio attivo di confronto.

Dispnea	Marbo 4%	Enro 5%
0	1,290 ± 0,15	1,350 ± 0,19
1	0,806 ± 0,13	1,200 ± 0,16
2	0,328 ± 0,10	0,684 ± 0,12
3	0,158 ± 0,07	0,171 ± 0,09

Tabella 4. Dispnea nei suini trattati. Punteggi medi ed errore standard delle medie.

Table 4. Dyspnea in treated pigs. Mean scores and averages standard error.

Lo stesso si può dire per la dispnea, che notoriamente caratterizza le forme a evoluzione peracuta: la regressione sintomatologica è stata sovrapponibile tra i due gruppi, ma l'effetto di marbofloxacin è stato più rapido.

ESITO DEL TRATTAMENTO	TRATTAMENTI (P<0.05)		
	Marbo 4%	Enro 5%	TOTALE
MALATI	5	16	21
	4,90%	15,69%	20,59%
GUARITI	51	18	69
	50%	17,65%	67,65%
MORTI	6	6	12
	5,88%	5,88%	11,76%
TOTALE	62	40	102
	60,78%	39,22%	100%

Tabella 5. Esito dei trattamenti. Per ogni esito: sulla prima riga la numerosità e sulla seconda riga la % dei casi (a fine trattamento).

Table 5. Outcome of treatments. For each outcome: on the first line the number and on the second line of the percentage of cases (at the end of treatment).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La differente numerosità dei gruppi, ininfluente sull'attendibilità dell'analisi statistica, è stata determinata dal fatto che, nell'allevamento a ciclo chiuso, marbofloxacin 4% è già in uso con risultati soddisfacenti. Perciò, veterinario aziendale e allevatore hanno preferito applicarlo nei casi clinicamente più gravi di malattia respiratoria.

La scelta di utilizzare abbattimento e inappetenza, rilevati in coincidenza con i razionamenti giornalieri, come sistema d'accesso all'intervento terapeutico, ha permesso una selezione oggettiva dei suini da trattare, depurando la stessa dagli errori normalmente connessi alla rilevazione, inevitabilmente soggettiva, dei sintomi temporanei, come la tosse.

Per quanto riguarda l'efficacia dei trattamenti, si consideri la rilevanza della regressione rapida di abbattimento e inappetenza, che consente di limitare le conseguenze organiche generali e quindi i mancati incrementi ponderali durante la fase clinica; il contenimento del danno produttivo ed economico consente di valutare positivamente i benefici ottenuti rispetto ai costi del trattamento.

All'osservazione più precisamente clinica, che ha interessato tosse e dispnea, le differenze iniziali tra i gruppi, pur non statisticamente significative, sono state più sensibili; ciò è dipeso principalmente dalle difformità evolutive della malattia respiratoria nei singoli soggetti, che a loro volta derivano dalla situazione organica dell'animale e dal livello di patogenicità dei cloni batterici coinvolti.

In conclusione, si può affermare che il confronto tra i trattamenti ha fornito risultati regolarmente favorevoli a marbofloxacin 4%, sia per la regressione sintomatologica sia per il recupero funzionale, in termini di vitalità e crescita.

L'evidenza, già di per sé importante, è ancora più rilevante se si considerano due aspetti pratici: la quantità di marbofloxacin somministrata è minore rispetto a quella dell'enrofloxacin e ciò contiene il costo del trattamento; inoltre, nelle forme cliniche acute, qualsiasi intervento con questa formulazione del principio attivo, anche in urgenza comporta un tempo di sospensione di 6 giorni, a fronte di 10 giorni per il prodotto di confronto.

Sulla base dei risultati della nostra prova in campo, possiamo quindi oggettivamente affermare

che la preparazione a base di marbofloxacine è pienamente efficace sulle complicanze batteriche della malattia respiratoria polifattoriale del suino nella fase di magronaggio – ingrasso e che la stessa ha fornito risultati migliorativi nel confronto con una preparazione di enrofloxacin a maggior concentrazione di principio attivo.

BIBLIOGRAFIA

- Amass S.F., Clark L.K., Van Alstine W.G., Boersock T.L., Murphy D.A., Knox K.E., Albregts S.R. (1994). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. JAVMA, 204:102-107.
- Done S. & White M. (2003). **Porcine respiratory disease and complexes**: The story to date. In practice, 25 (7): 410-417.
- Giacomelli P., Laniado E. (1988). Un modello di simulazione per la gestione di allevamenti suini. Rivista di Economia Agraria, 4: 12-16.
- Losinger W.C. (2005). Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on grower/finisher swine operations in the United States. Prev Vet Med, 68 (2/4): 181-193.
- Pointon A.M., Byrt D., Heap P. (1985). Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. Aust Vet J, 62 (1): 13-18.
- Ross R.F. (2006). *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. An Health Res Rev, 7 (1-2): 13-29.
- Sala V. (2011). Costi e benefici in suinicoltura: il ruolo del veterinario. Summa, Animali da Reddito 6 (7): 30-34.
- Sala V., De Faveri E. (2013). La sopravvivenza dei patogeni nell'aria: fattore critico o di rischio? Summa Animali da Reddito, 8 (10): 29-34.
- Sala V., Gusmara C. (1999). L'osservazione aziendale nella diagnostica sperimentale della malattia respiratoria del suino. Summa, 16 (5): 47-51.
- Sala V., Gusmara C., Bardini R., Leotti G. (2004). Ottimizzazione della gestione sanitaria ed effetti sulla qualità della produzione in una nuova azienda suinicola a ciclo completo. Atti XXX Convegno SIPAS, pp. 305-314.
- Sala V., Persico F., Terreni M. (1996). La malattia respiratoria del suino: considerazioni sulla chemioprolifassi strategica. Rivista di Zootecnia e Veterinaria, 24: 15-24.

INTRODUZIONE DELLA VACCINAZIONE ANTI PRRSV CON PROGRESSIS® IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO CHE GIÀ VACCINAVA LE SCROFE CONTRO PCV2 CON CIRCOVAC®

INTRODUCTION OF PRRSV VACCINATION WITH PROGRESSIS® IN AN ITALIAN HERD VACCINATING SOWS WITH CIRCOVAC®

F. SALVINI¹, G. LEOTTI², F. JOISEL³

¹Veterinario L.P., PigVet- Brescia;

²Merial Italia, Milano;

³Merial S.A.S., Lione, Francia

Parole chiave: scrofa, PRRSV, PCV2, vaccini, dati produttivi, impatto economico

Key Words: sow, PRRSV, PCV2, vaccines, production data, economic impact

Riassunto. Gli Autori descrivono un'esperienza di campo condotta in un allevamento italiano a ciclo chiuso e con buon *management* con introduzione di nuove misure di gestione e della vaccinazione contro PRRSV mediante il vaccino PROGRESSIS® e successivo miglioramento delle performances riproduttive; i riproduttori erano già vaccinati contro PCV2 con il vaccino CIRCOVAC®.

Abstract. This case report illustrates the benefits of modification in herd management practices and the progressive introduction of PRRSV vaccination with PROGRESSIS® in addition to PCV2 vaccination (CIRCOVAC®) on reproductive performance in a well-managed operation (farrow to finish system) located in Italy.

INTRODUZIONE

Tale comunicazione rappresenta quello che comunemente è identificato, nei Congressi Internazionali, come un "Case report". Il Veterinario aziendale, in stretta collaborazione con l'allevatore, ha adottato una serie di misure relative non solo al miglioramento del *management* aziendale, ma anche estese a un controllo indiretto e diretto delle più importanti patologie presenti in allevamento, in particolare mediante vaccinazioni delle scrofette e scrofe rivolte verso il PCV2 in un primo tempo e poi anche verso PRRSV successivamente. L'equilibrio sanitario raggiunto e mantenuto per un lungo periodo, ormai superiore ai tre anni di osservazione, ha permesso di raggiungere livelli riproduttivi e produttivi crescenti e di elevato livello, considerando la tipologia del sistema di allevamento utilizzato.

MATERIALI E METODI

Caratteristiche dell'allevamento

L'allevamento oggetto di osservazione adotta un sistema di allevamento a ciclo-chiuso tradizionale in unico sito: sono presenti circa 1100 scrofe e il flusso degli animali è del tipo "continuo". Le scrofette di rimonta sono prodotte in azienda e le fasi di accrescimento e prima gestazione si svolgono in locali dedicati fino al momento del primo parto.

L'allevamento è ufficialmente indenne da Malattia di Aujeszky e infetto da PRRSV e PCV2.

Sistema di raccolta dei dati

Tutti i dati raccolti in allevamento sono stati forniti dal Veterinario aziendale e dal proprietario dell'allevamento, che ci ha fornito alcuni rapporti scritti, documenti cartacei e informatici: questi ultimi sono stati estratti dal software di archiviazione aziendale dei dati riproduttivi.

Accertamenti diagnostici

La situazione sanitaria sopra descritta è stata più volte confermata sia recentemente e sia nel corso degli ultimi anni da corretti e regolari rilievi di laboratorio.

Eventi

In tabella 1 è riportata, in sintesi, la sequenza temporale delle principali misure adottate nel corso dei quattro anni utilizzati per la raccolta dati.

Tabella 1. Sequenza temporale delle principali misure adottate nel corso dei 4 anni utilizzati per la raccolta dati

Table 1. Schedule of events and main utilized actions over 4 consecutive years pending data collection

Periodo	Operazione
2010-2012	Miglioramento progressivo della qualità del mangime
2011/2012	Età dello svezzamento portata da 3 a 4 settimane di vita
Fine 2012	Abbandono della pratica di sincronizzazione dell'estro
Febbraio 2010	Avvio di un programma di vaccinazione delle scrofette e scrofe col vaccino CIRCOVAC® (2 ml, IM) nel rispetto delle indicazioni del produttore
2011	Avvio di un programma vaccinale contro PRRSV delle sole scrofette mediante il vaccino PROGRESSIS® (2 ml, IM, vaccinazione di base in fase di accrescimento e richiamo a 70-80 giorni di gestazione)
2012	Inserimento di una vaccinazione di massa delle scrofe mediante il vaccino PROGRESSIS® con successive vaccinazioni di richiamo a 70-80 giorni di gestazione
2° quadrimestre 2012	Vaccinazione con PROGRESSIS® al 7° giorno di lattazione e al 70° giorno di gestazione
A metà 2013	Cambio genetica delle scrofette e introduzione di una medicazione delle scrofe nel periparto

RISULTATI

Nella tabella 2 sono riportati i dati relativi alla fertilità e alla prolificità aziendali.

Tabella 2. Dati di fertilità e prolificità in tre anni completi e consecutivi (2010-2011-2012) e parte del 2013.

Table 2. Fertility and prolificacy data over three full and consecutive years (2010-2011-2012) and part of 2013.

	2010	2011	2012	2013*
Totale scrofe/tte produttive	1116	1044	1123	1118
N° di fecondazioni	3007	2845	2914	2284
N° di parti	2507	2540	2695	2105
% Portata al parto	83,4	89,3	92,5	92,16
N° di aborti	58	40	38	23
% aborti (n. aborti/gravide)	2,3	1,6	1,4	1,0
N° di fecondazioni (scrofette)	711	609	638	467
N° di parti (scrofette)	589	560	585	397
% Portata parto (scrofette)	82,8	92,0	91,7	85,0
ISCU (giorni)	6,77	7,32	6,24	5,75
Giorni di gestazione	114,56	115,41	115,76	116,05
Giorni di lattazione	24,64	27,74	27,81	27,91
Interparto (giorni)	145,97	150,47	149,81	149,71
N° di parti	2507	2540	2695	2105
Media nati vivi / nidiata	11,87	12,84	13,81	13,70
Totale svezzati	24931	26600	30885	22849
Media svezzati / nidiata	9,94	10,47	11,46	11,74
Media svezzati/scrofa/anno	24,87	25,40	27,92	28,61

* Dati relativi e completi solo fino alle fecondazioni effettuate entro il 15/10/2013

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il piano di rimonta adottato in quest'allevamento ha portato a una progressiva riduzione del numero medio di parti effettuati per scrofa produttiva. E' stato rilevato, nel corso dell'intero periodo di osservazione, un prolungamento della durata del periodo di gestazione (da 114,56 a 116,05 giorni) e dell'indice percentuale di portata al parto (da 83,4% a 92,16%). In seguito all'implementazione della vaccinazione contro PRRS alle scrofette l'indice percentuale di portata al parto di questa categoria di riproduttori è cresciuto da 82,8% a

91,7% nel 2012. Le elevate temperature ambientali raggiunte nell'estate 2013, e il contestuale cambio di linea genetica delle scrofette hanno probabilmente inciso sulla riduzione dell'indice percentuale di gestazione delle scrofette stesse nel corso del 2013.

In seguito all'implementazione delle vaccinazioni alle scrofe sopra indicate l'indice percentuale di portata al parto dell'intero parco scrofe si è portato da 83,4% rilevato nel 2010 al 92,16% nel 2013: l'indice percentuale di portata al parto in quest'allevamento è quindi cresciuto di oltre 10 punti percentuali dal 2010 alle ultime rilevazioni effettuate nel 2013.

I parametri di prolificità e produttività dei suinetti sono aumentati nel periodo 2010-2012 nonostante l'allungamento della durata media del periodo di gestazione: il numero medio di suinetti nati vivi per scrofa e per anno è aumentato di 3,51 unità, mentre, al momento, tale indice risulta in modesta riduzione nel corso del 2013 a causa, a nostro parere, delle ragioni più sopra esposte.

Il numero medio di suinetti svezzati per scrofa è aumentato di 3,74 suinetti dal 2010 al 2013 (da 24,87 a 28,61).

L'analisi critica dei dati riportati in questo "Case report" supporta la convinzione degli autori: l'implementazione della vaccinazione con PROGRESSIS® delle scrofette e delle scrofe (già vaccinate da oltre un anno con CIRCOVAC® al momento dell'inizio delle vaccinazioni contro PRRS) di quest'allevamento si è rivelata una misura utile per migliorare ulteriormente o consolidare gli indici di fertilità, prolificità e produttività nel corso di quasi quattro anni consecutivi di osservazione.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il sig. Pierluigi Mamusa proprietario dell'allevamento, per l'indispensabile e professionale aiuto fornito per la realizzazione di questo lavoro.

®PROGRESSIS e CIRCOVAC sono marchi registrati da Merial in Italia e in tutto il mondo.

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN REGOLATORE PROMETABOLICO IN SUINETTI NEONATI

THE EFFECT OF SUPPLYING PROMETABOLIC REGULATOR TO JUST BORN PIGLETS

SCOLLO A.^{1,2}, AVANZINI C.¹, CONTIERO B.², MONDIN P.³, MAZZONI C.¹

¹ Medico Veterinario Suivet;

² Università di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute;

³ Huvepharma NV

Parole chiave: Suinetto, prometabolico, lattazione, mortalità, antibioticoresistenza.

Key words: Piglet, prometabolic, lactation, mortality, antibiotic-resistance.

Riassunto: In sala parto, l'adozione di un management efficace è diventato il punto focale della redditività aziendale; ciò è dovuto al fatto che negli ultimi anni si è assistito ad un incremento del numero di nati conseguente all'aumentato impiego di scrofe iperprolifiche in scrofaia. Scopo del presente lavoro è stato determinare l'efficacia della somministrazione neonatale di un regolatore prometabolico derivato dalla fermentazione della patata, con particolare attenzione alla mortalità pre-svezzamento ed all'utilizzo di farmaci nei suinetti, come conseguenza del potenziale miglioramento del sistema immunitario dovuto ad un'aumentata assunzione di colostro. La prova ha coinvolto un totale di 806 suinetti, di cui 413 appartenenti al gruppo controllo e 393 del gruppo alimentato con supplemento prometabolico (due somministrazioni a 12 ore di distanza, la prima subito dopo la nascita). È stata registrata sia la mortalità (per schiacciamento, inedia, diarrea e altre cause) che il consumo di farmaci. Ne è emersa una minore mortalità durante la lattazione, ed in particolare quella causata da inedia. Inoltre, è stato registrato un minore utilizzo di antibiotici e antinfiammatori. I risultati suggeriscono l'impiego di un regolatore prometabolico come una valida soluzione in grado di coniugare sia il profitto aziendale che la crescente attenzione in merito all'utilizzo di antibiotici nell'allevamento suino.

Abstract: The efficient management of the farrowing room is the goal of the herd profitability, especially in recent years, which have seen an increase in the number of births resulted from the use of iperprolific sows. The aim of this work was to determine the effectiveness of neonatal administration of a prometabolic regulator, obtained from the fermentation products of the potato, in influencing pre-weaning mortality and consumption of drugs in piglets as a result of the potential improvement of the immune system due to an increased intake of colostrum. The trial involved a total of 806 piglets, of which 413 belonging to the control group and 393 in the group fed with supplying prometabolic (two doses 12 hours apart, the first immediately after birth). Mortality (due to crushing, starvation, diarrhea and other causes) and the administration of drugs were recorded. It resulted in a lower mortality during lactation, particularly caused by starvation. In addition, there has been reduced use of antibiotics and anti-inflammatories. The results suggest that the use of a prometabolic regulator could be a sustainable solution that allow herds profit and reduce the critical controversy on antibiotic-resistance.

INTRODUZIONE

Nei Paesi ad elevata produzione suinicola, la mortalità pre-svezzamento varia dall'11 al 13%, con un ulteriore 7-8% di suinetti nati morti (PigCHAMP, 2011). Tuttavia, tali dati variano enormemente da azienda ad azienda, con tassi che scendono al 5-7% per la mortalità dei nati vivi (Lawlor and Lynch, 2005; Andersen et al., 2007) ed inferiori al 5% dei nati morti (Muirhead and Alexander, 1997). La differenza tra questi risultati è ascrivibile al diverso management adottato dalle aziende, come descritto nel dettaglio nella review di Kirkden et al. (2013). In sala parto, l'adozione di un management quanto più efficace possibile è diventato un punto focale della redditività aziendale, dovuto soprattutto al fatto che negli ultimi anni si è assistito ad un incremento del numero di nati conseguente all'aumentato impiego di un maggior numero di scrofe iperprolifiche in scrofaia (English, 1993). I primi giorni di vita del suinetto acquisiscono criticità sempre maggiori (Cronin et al., 2000; Marchant et al., 2000), ed il parto diventa il momento in cui le scelte manageriali sono indispensabili per il ritorno economico aziendale.

I fattori che rientrano nel concetto di management in sala parto sono molteplici, e spaziano dalla scelta della genetica alla gestione microclimatica ambientale, dall'applicazione corretta di principi igienico-sanitari al pareggiamento della nidiata, senza dimenticare l'alimentazione della scrofa e la gestione dei farmaci (Kingston, 1989; Lay et al., 2002). Tuttavia, talvolta anche un corretto management può non essere sufficiente a ridurre al minimo la mortalità neonatale; l'assistenza al parto e la cura dei suinetti sottopeso possono rappresentare una fonte di miglioramento (Kirkden et al., 2013). In particolare, è frequente sottovalutare le perdite di suinetti dovute ad inedia o disidratazione, e queste ultime insorgono se la scrofa ha una scarsa montata lattea o se il suinetto non è abbastanza energico da riuscire a consumare sufficiente colostro (Hughes, 1992). Nelle prime ore di vita, il rischio per i suinetti deboli o sottopeso di fallire la loro competizione per le risorse alimentari è elevato: assisterli nelle prime suzioni o alimentarli manualmente con colostro o alimenti supplementari può rappresentare fonte di inaspettato miglioramento (Kirkden et al., 2013).

Scopo del presente lavoro è stato determinare l'efficacia della somministrazione neonatale di un regolatore prometabolico derivato dai prodotti di fermentazione della patata, con particolare attenzione alla mortalità pre-svezzamento. Inoltre, si attendeva una riduzione del consumo di farmaci nei suinetti, come conseguenza del potenziale miglioramento del sistema immunitario dovuto ad un aumentata assunzione di colostro osservato da Smulders e Kanora (2012).

MATERIALI E METODI

Animali e management

Lo studio è stato condotto in una scrofaia intensiva a ciclo aperto, ed ha coinvolto un totale di 806 suinetti appartenenti a 71 scrofe. I parti sono stati sincronizzati ed assistiti da personale formato; alla fine della giornata, sono stati effettuati i baliaggi all'interno dei gruppi di trattamento, in modo da pareggiare le nidiatae per numero e dimensione dei suinetti. Tutte le nidiatae erano alloggiare in locali identici tra loro, facenti parte del medesimo capannone e gestiti con uguale management generale.

Gruppi di trattamento

Le 71 nidiatae sono state casualmente divise in due gruppi: il gruppo di trattamento sperimentale (n = 393 suinetti) ha ricevuto due dosi per via orale di un regolatore prometabolico (Lianol® Colostro, Huvepharma) a base di proteine derivate dalla fermentazione della patata (1 ml di prodotto per ciascuna dose). La prima dose è stata

somministrata subito dopo la nascita, mentre la seconda a distanza di 8-12 ore. I restanti 413 suinetti sono stati invece destinati al gruppo controllo, senza alcuna assunzione di prodotto post-nascita.

Parametri osservati

Per ognuna delle 71 scrofe sono stati registrati la numerosità della nidiata, l'ordine di parto e la mortalità giornaliera dei suinetti fino allo svezzamento, annotandone anche la causa del decesso (schiacciamento, inedia, diarrea, altro). Inoltre, è stato registrato qualsiasi trattamento farmacologico effettuato nei suinetti per tutta la durata della lattazione, annotando natura della medicazione, numero di somministrazioni e volume iniettato.

Analisi statistica

Il tasso di mortalità è stato analizzato utilizzando la PROC GENMOD con modello di Poisson (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). I dati relativi alle medicazioni sono stati invece elaborati con un test di student, considerando la quantità espressa di mg di sostanza attiva inoculata in media a ciascun suinetto della nidiata.

RISULTATI

I dati relativi alla mortalità sono riportati nella Tabella 1. L'inedia è stata la causa di morte che ha mostrato differenze significative tra i due gruppi sperimentali ($P < 0.0001$), con riduzione nel gruppo di trattamento con prometabolico. Inoltre, lo stesso gruppo ha mostrato una drastica riduzione nell'utilizzo di antibiotici ed antinfiammatori ($P = 0.041$ e 0.012 rispettivamente, Figura 1).

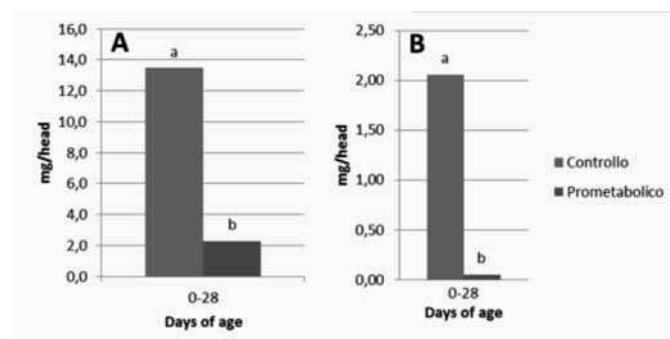
Tabella 1. Rischio relativo (RR) di mortalità dei suinetti dalla nascita allo svezzamento. CI: Intervallo di confidenza.

Table 1. Relative Risk (RR) for piglets mortality from birth to weaning. CI: confidence interval.

Causa di morte	Media (%)		RR (95% CI)	P value
	Prometabolico	Controllo		
Schiacciamento	3.33	3.62	1.09 (0.84-1.39)	0.512
Inedia	0.22	2.05	9.31 (4.43-19.6)	<.0001
Diarrea	1.41	1.39	0.98 (0.66-1.46)	0.930
Altro	3.02	3.33	1.10 (0.85-1.43)	0.457

Figura 1. Mg di principio attivo per suinetto dalla nascita allo svezzamento.
A: Antibiotici; B: Antiinfiammatori.

Figure 1. Mg of active substance per piglet from birth to weaning.
A: Antibiotics; B: Anti-inflammatory.



DISCUSSIONE

La somministrazione di un supplemento alimentare con l'effetto di regolazione prometabolica nei suinetti subito dopo la nascita ha ridotto la mortalità dei suinetti durante la lattazione, con forte significatività per quanto riguarda le perdite dovute ad inedia. L'inedia è una tra le principali cause di morte neonatale, ed è descritta da Hughes (1992) come il risultato dell'impossibilità per il suinetto di consumare sufficiente colostro. Durante le prime ore di vita infatti, il suinetto deve competere vigorosamente per assicurarsi l'accesso al capezzolo, ed i soggetti deboli o sottopeso sono quelli maggiormente a rischio di soccombere. I risultati del presente lavoro sono in accordo con quanto illustrato da Kirkden et al. nella sua recentissima revisione (2013), in cui la somministrazione di un supplemento alimentare viene descritta come una scelta manageriale utile a ridurre le perdite. Naturalmente è importante sottolineare che, nella stessa revisione, gli autori danno altrettanta importanza ad una corretta gestione del pareggiamento della nidata, e che le due scelte manageriali insieme danno luogo ai risultati migliori.

Nella pratica aziendale, la somministrazione di alimento supplementare non è sempre effettuata. Tuttavia, quando viene attuata, la scelta ricade il più delle volte sul colostro prelevato manualmente dalle scrofe partorienti. L'importanza di una buona colostratura è così elevata che negli ultimi anni la somministrazione forzata di colostro sta diventando sempre più diffusa (Herpin e Le Dividich, 1995). Purtroppo, la raccolta di colostro richiede di per sé molto tempo ed una buona manualità, divenendo pratica di difficile realizzazione nelle aziende con poco personale disponibile. Il successo stesso della pratica sembra essere fortemente dipendente dalla capacità dell'operatore che se ne occupa (Cutler et al., 2006; Hemsworth et al., 1995). In questo contesto, la somministrazione di un supplemento alternativo al colostro ma con la capacità di dare gli stessi effetti può rappresentare una valida soluzione.

L'ipotesi che la somministrazione di un regolatore prometabolico, derivato dai prodotti della fermentazione della patata, aumenti l'*intake* di colostro era già stata proposta da Smulders e Kanora (2012), che formularono l'ipotesi che ciò accada proprio grazie al conseguimento della soglia energetica necessaria al suinetto debole o sottopeso per poter

raggiungere rapidamente il capezzolo materno. Oltre alla ridotta mortalità, il secondo vantaggio dell'aumentata assunzione di colostro è il conseguente miglioramento del trasferimento dell'immunità passiva dalla madre al suinetto. Gli stessi autori infatti, hanno dimostrato un significativo aumento del livello di IgG sieriche nei neonati dopo l'assunzione del regolatore prometabolico. Questo potrebbe essere alla base del benefit registrato nel presente lavoro relativo all'utilizzo di medicinali nel periodo della lattazione. Di particolare interesse, è emerso il minore uso di antibiotici nei suinetti alimentati con il prometabolico.

L'uso di antibiotici già nelle primissime fasi di vita dei suinetti è una pratica largamente diffusa da decenni per contrastare l'insorgenza di patologie in uno stadio così delicato come la lattazione. Conseguenza della ridotta assunzione di colostro è infatti l'incremento di infezioni neonatali (Edwards, 2002). Tuttavia, negli ultimi anni è argomento di forte discussione l'antibioticoresistenza, dovuta ad un utilizzo talvolta eccessivo e scorretto degli antibiotici sia in zootecnia che in medicina umana. L'eccessivo impiego di antibiotici infatti è ritenuto essere alla base della selezione di popolazioni batteriche resistenti e dunque più pericolose e difficili da trattare. L'antibioticoresistenza si trova attualmente al centro di un dibattito che coinvolge fortemente l'opinione pubblica, ed è riconosciuto anche dal Parlamento Europeo che nel 2011 sviluppa un "Piano d'azione contro la crescente minaccia dell'antibioticoresistenza" (EU Commission, 2011). In questa ottica, la scelta di un regolatore prometabolico in grado sia di ridurre la mortalità del suinetto in lattazione che di diminuire l'utilizzo di farmaci sembra rappresentare una valida soluzione in grado di coniugare sia il profitto aziendale che la crescente attenzione relativa all'utilizzo dei farmaci in azienda.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen, I. L., G. M. Tajet, I. A. Haukvik, S. Kongsrud, and K. E. Bøe. 2007. Relationship between postnatal piglet mortality, environmental factors and management around farrowing in herds with loose-housed, lactating sows. *Acta Agric. Scand., Sect. A* 57:38–45.
- Cronin, G. M., B. Lefébure, and S. McClintock. 2000. A comparison of piglet production and survival in the Werribee Farrowing Pen and conventional farrowing crates at a commercial farm. *Aust. J. Exp. Agric.* 40:17–23.
- Cutler, R. S., A. F. Fahy, G. M. Cronin, and E. M. Spicer. 2006. Prewaning mortality. In: B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor, editors, *Diseases of swine*, 9th ed. Blackwell, Ames, IA. p. 993–1009.
- Edwards, S.A.. 2002. Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions? *Livestock Production Science* 78 (2002) 3–12.
- English, P. R. 1993. Factors affecting neonatal piglet losses and management practices to minimize such losses. In: M.-E. Raw and T. J. Parkinson, editors, *The veterinary annual*, vol. 33. Blackwell, Oxford, UK. p. 107–119.
- EU Commission, 2011. Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance.
- Hemsworth, P. H., G. J. Coleman, G. M. Cronin, and E. M. Spicer. 1995. Human care and the neonatal pig. In: M. A. Varley, editor, *The neonatal pig: Development and survival*. CAB International, Wallingford, UK. p. 313–331.

Herpin, P., and J. Le Dividich. 1995. Thermoregulation and the environment. In: M. A. Varley, editor, The neonatal pig: Development and survival. CAB International, Wallingford, UK. p. 57–95.

http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/docs/communication_amr_2011_748_en.pdf
<http://www.pigchamp.com/Products/Benchmarking/AboutBenchmarking/OverviewandDefinitions/SummaryArchives.aspx>.

Hughes, P. E. 1992. Postnatal care in pigs. In: M. A. Varley, P. E. V. Williams, and T. L. J. Lawrence, editors, Neonatal survival and growth. BSAS Occasional Publication No 15. British Society for Animal Science, Penicuik, UK. p. 149–161.

Kingston, N. G. 1989. Farrowing house management. *Pig Vet. J.* 22:62–74.

Kirkden, R. D., D. M. Broom and I. L. Andersen, 2013. INVITED REVIEW: Piglet mortality: Management solutions. *J Anim Sci* 2013, 91:3361-3389.

Lawlor, P. G., and P. B. Lynch. 2005. Management interventions to help keep piglets alive in large litters. *Ir. Vet. J.* 58:640–645.

Lay, D. C., Jr., R. L. Matteri, J. A. Carroll, T. J. Fangman, and T. J. Safranski. 2002. Preweaning survival in swine. *J. Anim. Sci.* 80(E. Suppl. 1):E74–E86.

Marchant, J. N., A. R. Rudd, M. T. Mendl, D. M. Broom, M. J. Meredith, S. Corning, and P. H. Simmins. 2000. Timing and causes of piglet mortality in alternative and conventional farrowing systems. *Vet. Rec.* 147:209–214.

Muirhead, M. R., and T. J. L. Alexander. 1997. Managing pig health and the treatment of disease: A reference for the farm. 5M, Sheffield, UK.

PigCHAMP. 2011. Summary archives.

Smulders D e Kanora A, 2012. Fermented potato protein enhances immunoglobulin levels and reduced pre-weaning mortality in piglets. *Proceedings IPVS 2012*, 555.

IL PROGRAMMA DI GESTIONE INDIVIDUAL PIG CARE (IPC) E MIGLIORAMENTO DELLO STATO SANITARIO DI SUINI IN SVEZZAMENTO IN ALLEVAMENTI A BASSO LIVELLO SANITARIO

E. VIZCAINO¹, ML ROSAS², A. DEREU³, P. DONCECCHI³, C. PIÑEIRO¹ AND J. MORALES¹, M. E. TECLI⁴

¹PigCHAMP Pro Europa, Spain;

²Swine Vet Practitioner, Spain;

³Zoetis – EuAFME, France;

⁴Zoetis – EuAFME, Italy

Key words: individual pig care, piglets, health management.

Parole chiave: Individual pig care, suinetti, Gestione sanitaria.

ABSTRACT

The individual pig care (IPC) is a management program based in daily individual observation of the pigs, early detection of husbandry and health problems and prompt and accurate reaction to them, enabled by a fast and effective data collection and processing. Registration and monitoring of health indicators and antimicrobials used proposed by the IPC program promotes a more judicious use of medication.

RIASSUNTO

L'individual pig care (IPC) è un programma di gestione basato sull'osservazione individuale e quotidiana dei suini, sulla diagnosi precoce di problematiche zootecniche e sanitarie e quindi soluzioni rapide alle stesse, grazie ad una rapida ed efficiente raccolta ed elaborazione dati. La registrazione ed il monitoraggio degli indicatori sanitari e degli antibiotici usati, grazie al programma IPC, portano giocoforza ad un uso molto più razionale dell'antibiotico.

INTRODUZIONE

L'individual pig care (IPC) è un programma di gestione basato sull'osservazione individuale e quotidiana dei suini, sulla diagnosi precoce di problematiche zootecniche e sanitarie e quindi soluzioni rapide alle stesse, grazie ad una rapida ed efficiente raccolta ed elaborazione dati. L'obiettivo del presente studio è quello di valutare i vantaggi dell'applicazione del sistema IPC in suini in fase di svezzamento, in un allevamento spagnolo a basso standard sanitario, basandosi sullo stato sanitario di quest'ultimi.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta nella fase di svezzamento di un allevamento a ciclo chiuso convenzionale. Ogni settimana viene svezzato un gruppo di 150 suinetti di 8 giorni di età. L'azienda è PRRS positiva con alta incidenza di poliartriti ed enteriti in fase di svezzamento, con alte percentuali di mortalità e scarti. Di routine, in questa fase vengono utilizzate medicazioni di massa (Zn ossido, colistina ed amoxicillina), e, per contro, vengono effettuati pochissimi interventi iniettabili individuali. Sono state registrate le percentuali di mortalità nei gruppi svezzati da Agosto 2012 ad Ottobre 2013. Ad Agosto 2013 è stato adottato il sistema di Gestione IPC. Secondo le linee guida IPC, I suini malati sono stati segnati ed i sintomi

quantificati in base alla gravità (A- leggeri segni malattia; B- media gravità; C- gravi segni; D- segni molto gravi o preagonici) ed al tipo di patologia (enterica, respiratoria, nervose, zoppie, morsiature o altro). I segni clinici e la mortalità sono stati monitorati in ogni gruppo dallo svezzamento (28 giorni di età) fino a 60 giorni di vita (circa 20 kg di p.v.). L'efficacia di IPC è stata valutata analizzando l'evoluzione della percentuale di mortalità utilizzando il processo di controllo statistico del software Minitab software.

RISULTATI

La percentuale di mortalità era del 4.89 % nel periodo Agosto 2012 - Agosto 2013, con picchi in alcuni gruppi anche maggiori del 6.0%. In seguito all'implementazione di IPC, la percentuale di mortalità si è significativamente ridotta (1.59% in media; 1.93%, 2.20% e 0.63% in Agosto, Settembre ed Ottobre 2013, rispettivamente). In più, dopo l'implementazione di IPC, gli antibiotici iniettabili sono diventati la scelta preferenziale per il trattamento dei sintomi clinici, a sfavore delle medicazioni di massa. Di conseguenza, la quantità globale degli antibiotici utilizzati in allevamento si è sensibilmente ridotta.

CONCLUSIONI

Questi risultati preliminari confermano che l'identificazione precoce dei sintomi di malattia attraverso IPC porta ad un recupero ottimale dei suini allevati in condizioni di basso status sanitario, che si traduce in una riduzione della mortalità. La registrazione ed il monitoraggio degli indicatori sanitari e degli antibiotici usati, grazie al programma IPC, portano gioco forza ad un uso molto più razionale dell'antibiotico.

PREMIO GUADAGNINI 2014

LA MORSICATURA DELLA CODA NEL SUINO: È POSSIBILE EVITARE IL TAGLIO DELLA CODA NEL SUINO PESANTE?

TAIL BITING IN PIGS: IS IT POSSIBLE TO REAR THE HEAVY PIG AVOIDING TAIL DOCKING?

SCOLLO A.¹, DI MARTINO G.², GOTTARDO F.¹, CONTIERO B.¹, BONFANTI L.²

¹Università di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: Morsicatura della coda, suino, caudotomia.

Key words: Tail biting, swine, tail docking.

PARTE PRIMA: L'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

Studi sulla prevalenza del comportamento di morsicatura della coda sono stati condotti in molti dei Paesi dell'Unione Europea (EFSA, 2007). L'Italia non è tra questi, sebbene rappresenti una realtà zootecnica potenzialmente più a rischio a causa dell'estensione del ciclo di ingrasso per la produzione del suino pesante. Il raggiungimento della maturità sessuale delle femmine ed il prolungato permanere in ambienti intensivi poveri di stimoli possono infatti rappresentare fattori predisponenti il fenomeno. Inoltre, il progressivo aumento delle superfici minime per capo suggerito dalla legislazione vigente (D. Lgs. 7 luglio 2011, n°122) non prevede un adeguamento oltre i 100 kg di peso, con conseguente aumento dei kg/m² nell'ultima fase del ciclo.

Scopo del presente lavoro è stato identificare la prevalenza della morsicatura della coda in Italia adottando un approccio epidemiologico su larga scala (Smulders et al., 2008), completando il quadro europeo. Nel contesto dell'indagine, sono stati inoltre valutati i principali fattori di rischio aziendali presenti nella realtà del suino pesante.

MATERIALI E METODI

La ricerca ha considerato un campione di 56 allevamenti di suini pesanti commerciali situati nel nord Italia (Friuli Venezia Giulia, Veneto, Emilia Romagna e Lombardia). L'indagine ha riguardato una zona con un profilo di alta produzione nel settore suinicolo, nel quale il suino pesante è coinvolto nella produzione DOP. Come suggerito da Moinard et al. (2003), i dati raccolti in ciascuna azienda provenivano da suini stabulati secondo criteri simili ed alloggiati in uno o più capannoni della stessa tipologia in gruppi di suini omogenei. La raccolta dei dati si è svolta tramite una visita diretta delle aziende: in una prima fase gli allevatori sono stati sottoposti ad una intervista per mezzo di un questionario anonimo, mentre una seconda parte è stata dedicata all'osservazione degli animali ed alla rilevazione dei dati nei capannoni. L'elenco di informazioni raccolte durante l'indagine è stato studiato secondo quanto precedentemente riportato dall'analisi dei fattori di rischio di Taylor et al. (2012), ed ha coinvolto in toto il management aziendale, le strutture, la sanità, il microclima e l'alimentazione, per un totale di 36 *topics*.

Tutti gli animali presenti sono stati ispezionati per verificare la presenza di lesioni alla coda dovute a morsicatura, ed il dato è stato registrato con un modello binomiale

(presenza/assenza). Sono state registrate le lesioni considerate gravi (con perdita di tessuto) e/o con presenza di sangue (fresco e rosso o secco e scuro), mentre sono state tralasciati i graffi superficiali di dubbia connessione con la morsicatura. La selezione delle lesioni gravi ha permesso di registrare anche lesioni gravi verificatesi in momenti precedenti alla visita, che secondo Smulder et al. (2008) rimangono evidenti anche in seguito.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma SAS (SAS 9.1, SAS Institute Inc.). Test χ^2 con procedura Marascuilo sono stati eseguiti per verificare l'associazione tra la presenza di morsicatura della coda e fattori ambientali, caratteristiche degli animali e aspetti gestionali. In caso di associazione significativa ($P < 0.05$), le variabili sono state processate con la PROC FREQ per la determinazione dei rischi relativi.

RISULTATI

Considerando la percentuale di allevamenti con almeno un caso di morsicatura della coda, la più elevata prevalenza è stata riscontrata nelle fasi di svezzamento. Tuttavia, considerando invece la percentuale di animali con lesione sul totale dei suini osservati, le fasi di ingrasso si sono rivelate maggiormente critiche (Tabella 1).

Tabella 1. Prevalenza della morsicatura della coda

Table 1. Prevalence of tail biting

Fase di produzione	Allevamenti con almeno un caso di morsicatura della coda (%)	Animali con lesione alla coda (%)
Svezzamento	17.6	0.05
Ingrasso	11.1	0.34
Totale	15.4	0.15

I risultati relativi all'analisi del rischio per la morsicatura della coda sono riportati in Tabella 2. I tre fattori più importanti che influenzano l'incidenza della morsicatura della coda sono risultati essere la puntualità con cui vengono somministrati gli alimenti (distribuzione non puntuale: $P = 0,037$; $RR = 6.75$), la lunghezza della coda dopo la caudotomia (coda lunga: $P = 0,018$; $RR = 8.14$) e la presenza di animali allontanati dal loro gruppo a causa di fenomeni di morsicatura della coda ($P = 0,002$; $RR = 12.6$). Elevati *risk ratio* sono stati osservati anche in altri fattori considerati, sebbene con differenze statistiche non pienamente significative. La tendenza a dimostrare un maggior rischio di morsicatura della coda è stata rilevata nei suini di razza Danese ($RR = 2.71$), ed in assenza di patologie respiratorie ed enteriche ($RR = 3.50$). Per quanto riguarda i parametri ambientali e di gestione dell'allevamento, le lesioni alla coda sono risultate essere più frequenti negli allevamenti dove la densità degli animali era oltre il limite di legge ($RR = 5.00$), con livelli di ammoniaca superiori a 10 ppm ($RR = 2.50$) e con temperatura all'interno del capannone superiore al comfort termico per l'età degli animali ($RR = 2.14$). Inoltre, la collocazione degli abbeveratoi nella zona di riposo sembra favorire l'insorgenza della problematica ($RR = 3.50$), come anche il rapporto insufficiente tra lo spazio in mangiatoia ed il numero di animali presenti ($RR = 3.00$).

Tabella 2. Rischio relativo per ciascun fattore analizzato in allevamento.

Table 2. Relative risk analysis for the factors considered in the study, analyzed at farm level.

Categoria di rischio	Comparazione	RR	Intervalli di confidenza 95%	P
Background e storia sanitaria				
Genetica	Danese vs. altro	2.71	0.47 – 15.75	0.258
Ciclo produttivo	Chiuso vs. aperto	1.17	0.19 – 7.07	0.867
Stagione	Calda vs. fredda	2.14	0.38 – 12.24	0.388
Fase di allevamento	Svezzamento vs. ingrasso	1.59	0.19 – 13.15	0.660
Numero di suini per box	<25 vs. >25	1.17	0.19 – 7.07	0.867
Patologie respiratorie ed enteriche	Assenza vs. presenza	3.50	0.42 – 29.39	0.208
Management ed ambiente				
Densità di allevamento	Alta vs. bassa	5.00	0.39 – 64.39	0.186
Pavimentazione	Grugliato vs. pieno	1.56	0.21 – 11.61	0.656
Livelli di ammoniaca	>10ppm vs. ≤10ppm	2.50	0.29 – 21.40	0.686
Percezione olfattiva di scarsa qualità dell'aria	Presenza vs. assenza	2.25	0.38 – 13.27	0.365
Sistemi di mantenimento della temperatura ottimale	No vs. si	1.75	0.24 – 12.86	0.592
Ventilazione	Artificiale vs. naturale	1.88	0.22 – 15.63	0.547
Area di defecazione delimitata	No vs. si	1.59	0.19 – 13.15	0.660
Area di decubito sporca	Si vs. no	1.00	0.16 – 6.07	0.990
Spazio per il decubito laterale	Si vs. no	1.33	0.16 – 10.94	0.786
Abbeveratoi in area di decubito	Si vs. no	3.50	0.42 – 29.39	0.208
Un abbeveratoio ogni 10 suini	No vs. si	1.11	0.14 – 8.94	0.925
Spazio al truogolo	Insufficiente vs. buona	3.00	0.36 – 25.21	0.277
Distribuzione dell'alimento puntuale	Si vs. No	6.75	1.2 – 55.36	0.037
Pasto	Ad libitum vs. razionata	1.78	0.23 – 13.49	0.561
Tipologia di alimento	Pellet vs. broda	1.36	0.23 – 8.24	0.735
Rimescolamento				
Gruppi diversi mischiati durante il trasporto	No vs. si	1.58	0.22 – 11.58	0.659
Gruppi diversi mischiati in allevamento	No vs. si	1.09	0.18 – 6.48	0.923
Arricchimenti ambientali				
Substrati grufololabili	Si vs. no	1.17	0.19 – 7.07	0.867
Oggetti	Si vs. no	1.60	0.27 – 9.62	0.606
Morsicatura della coda e suo management				
Lunghezza della coda dopo la caudotomia	Lunga vs. corta	8.14	1.01 – 65.88	0.018
Presenza di suini rimossi dal gruppo a causa di lesioni	Si vs. no	12.6	1.63 – 97.12	0.002

DISCUSSIONE

L'interesse verso l'individuazione dei diversi fattori gestionali che possono ridurre le lesioni provocate dalla morsicatura alla coda è relativamente recente (Smulders et al., 2008). I dati finora raccolti sulla prevalenza della morsicatura della coda e sui fattori che ne determinano l'insorgenza sono limitati, soprattutto per quanto riguarda il suino pesante. Questa categoria di animali potrebbe presentare problemi maggiori rispetto al suino leggero a causa del prolungamento del ciclo di allevamento; il raggiungimento della maturità sessuale delle femmine ed il prolungato permanere in ambienti intensivi poveri di stimoli possono infatti rappresentare fattori predisponenti il fenomeno. Inoltre, il progressivo aumento delle superfici minime per capo suggerito dalla legislazione vigente (D. Lgs. 7 luglio 2011, n°122) non prevede un adeguamento oltre i 100 kg di peso, con conseguente aumento dei kg/m² nell'ultima fase del ciclo.

Nel presente studio, lo 0,15% di tutti gli animali indagati ha mostrato lesioni causate dalla morsicatura della coda. Sebbene Elbers et al. (1992) e Busch et al. (2004) abbiano riportato nei loro studi una prevalenza in fase di macellazione inferiore all'1%, altri autori che hanno condotto indagini direttamente in azienda hanno riportato percentuali ben più alte (Tiilikainen, 2000; Smulders et al, 2008; Holmgren and Lundeheim, 2004). Tuttavia, una riflessione origina dalla diversa attitudine al taglio della coda tra i diversi Paesi sede delle ricerche; mentre in alcuni Stati infatti la caudotomia è limitata o addirittura completamente bandita da norme interne più restrittive di quelle europee, in Italia la percentuale di suini caudotomizzati si avvicina al 100% (EFSA, 2007). È quindi necessario considerare l'ipotesi che la contenuta percentuale di lesioni alla coda registrata a livello italiano possa essere direttamente correlata proprio alla diffusa pratica dell'amputazione. A supporto di questa ipotesi, McIntyre (2003) afferma che suini non caudotomizzati risultano essere i principali destinatari di comportamenti aggressivi rediretti alla coda da parte dei compagni di box. Anche nel presente lavoro, la frequenza di lesioni alla coda è risultata essere associata alla lunghezza stessa della coda dopo l'amputazione: il rischio di morsicatura per i suini ai quali rimangono più vertebre coccigee sembra essere otto volte maggiore rispetto a quelli a coda più corta.

Un secondo fattore di rischio emerso è stato la puntualità nella distribuzione dell'alimento. Le aziende che hanno dichiarato di alimentare gli animali ad un orario che poteva subire dei saltuari ritardi o cambiamenti sono risultate essere quasi sette volte più a rischio rispetto alle aziende con distribuzione efficiente e precisa. È noto che i suini, quando alimentati ad orari prestabiliti, anticipano l'arrivo dell'alimento con comportamenti di agitazione ed inquietudine (Terlouw et al., 1993); è dunque presumibile che la morsicatura della coda faccia parte dei comportamenti orali inappropriati descritti da Rushen (1985) in caso di mancata distribuzione. L'arrivo imprevedibile del pasto potrebbe agire come un fattore di stress che aumenta il rischio di manipolazione orale della coda all'interno del box (Robert et al., 1991), e problematiche legate al sistema di alimentazione sono state individuate in campo anche da Paul et al. (2007). Sebbene in bibliografia si riporti un maggiore rischio per le aziende con distribuzione del pasto manuale, nel presente lavoro questo fattore sembra non avere particolare rilievo, in quanto una distribuzione manuale ma puntuale non ha fatto emergere la problematica.

Tra i maggiori fattori di rischio è emersa anche la presenza di soggetti con lesione alla coda separati dal gruppo. In caso di soggetti vittime di morsicatura infatti, la probabilità che altre lesioni insorgano nel box origine del focolaio, probabilmente per la presenza di uno o più soggetti morsicatori che scatenano la problematica e la rendono appetibile anche ad altri animali, che a loro diventano morsicatori. Inoltre, la propensione a mordere tende a

peggiore proprio con l'insorgenza delle prime lesioni a causa dell'attrazione per il sangue (Taylor et al., 2012).

Oltre a questi principali fattori di rischio, il presente lavoro ha evidenziato altre variabili con rischio relativo maggiore di 2, malgrado una significatività statistica più debole. Moinard et al. (2003) suggeriscono che, in caso di scarsa variabilità o limiti dovuti all'indagine epidemiologica stessa, anche tali fattori possono essere associati all'effetto. Ad esempio, se tutte le aziende visitate forniscono arricchimenti ambientali, non è possibile individuare una significatività statistica tra questi e la morsicatura della coda, sebbene la bibliografia riporti numerosi studi sperimentali che lo confermi. Probabilmente un ulteriore limite è la forte multifattorialità del fenomeno, che si manifesta solo in determinate condizioni frutto della combinazione tra diversi fattori.

PARTE SECONDA: LA PROVA DI CAMPO

Scopo del presente lavoro è stato verificare gli effetti, sul benessere di suini pesanti, dell'applicazione della norma comunitaria che vieta il taglio routinario della coda. La sperimentazione è stata effettuata in allevamento durante la fase di ingrasso. Inoltre, è stata verificata la possibilità di utilizzare la paglia quale arricchimento ambientale. Infatti, sebbene l'utilizzo di questo materiale sia consigliato per le produzioni di suino (EFSA, 2007; Van de Weerd e Day, 2009), la sua introduzione negli allevamenti intensivi è ostacolata dal rischio di occlusione dei sistemi di allontanamento dei reflui, soprattutto in caso di pavimentazione a grigliato, largamente presente nelle strutture di allevamento del suino pesante.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un allevamento da ingrasso intensivo (sito 3) produttore di suini pesanti. La prova ha interessato 672 suini (Landrace x Large White) di cui 336 maschi e 336 femmine. Gli animali si trovavano all'interno di un unico capannone, distribuiti in 24 box a sessi separati, ciascuno di 28 animali. La densità è stata mantenuta entro i limiti di legge (D. Lgs. 7 luglio 2011, n°122) per l'intera durata della prova. La pavimentazione era parzialmente fessurata ed era disponibile un parquet esterno con tettoia. All'interno di ciascun box sono state posizionate, come arricchimento ambientale, due catene di cui una gommata, e due volte a settimana venivano distribuiti sulla parte di pavimentazione piena 2 kg di segatura. L'alimentazione a broda era fornita due volte al giorno.

Tutti gli animali provenivano dallo stesso svezzamento e all'arrivo pesavano 25±3 kg per 80±4 giorni di vita. Ad una metà di loro era stato effettuato il taglio della coda, secondo le indicazioni di legge. Gli animali erano stati accasati in box mantenendo separati i maschi dalle femmine ed i caudotomizzati dai non caudotomizzati, inoltre in 12 box è stata posizionata su una parete una griglia a maglie di 5x5 cm contenente paglia trinciata lunga. Il disegno sperimentale 2x2x2 così organizzato era volto a verificare gli effetti della caudotomia, della presenza di paglia e del sesso sui parametri osservati.

Parametri osservati

Sei suini per ciascun box (144 in totale) sono stati identificati singolarmente tramite marca auricolare all'inizio della prova e sottoposti a prelievi di sangue effettuati a 7, 19 e 28 settimane di ingrasso. Sono stati valutati i seguenti parametri ematici: proteine totali, albumina, globuline, rapporto albumina/globuline (A/G) l'aptoglobina (Hp), antiossidanti sierici totali (TAS) e cortisolo.

Tutti i box sono stati osservati con metodo diretto per la valutazione del comportamento, utilizzando la tecnica dell'*instantaneous scan-sampling* (Martin e Bateson, 2007) con intervalli di 2 minuti tra una scansione e la seguente. Ad ogni scansione è stato registrato il numero di animali impegnati in attività esplorative, verso ciascuno degli arricchimenti ambientali, o distesi in atteggiamento di riposo. Le osservazioni, della durata di due ore durante la mattinata e di ulteriori due ore a cavallo del pasto pomeridiano, sono state effettuate a 3, 9, 18, e 29 settimane di ingrasso.

A 3, 14 e 22 settimane di ingrasso sono state valutate anche le lesioni alle orecchie ed alle code, secondo quanto suggerito da Widowski et al. (2003) e Sutherland et al. (2008). Le lesioni alle orecchie di ciascun suino sono state classificate secondo una scala a tre punteggi (0: assenza di lesioni; 1: lesioni lievi con perdita di setole, rossore, irritazione e piccoli graffi; 2: lesioni gravi con perdite di tessuto). Le code sono state valutate in base al coinvolgimento delle stesse per quanto riguarda l'accorciamento conseguenza delle lesioni (0: coda intatta; 1: presenza di più di metà coda; 2: presenza di meno di metà coda), gravità della lesione (0: assenza di lesioni; 1: lesioni lievi con perdita di setole, rossore, irritazione e piccoli graffi; 2: lesioni gravi con perdite di tessuto) e presenza di sangue (0: assenza di sangue; 1: sangue rosso e fresco; 2: sangue secco e scuro).

Gli animali sono stati monitorati anche in fase di macellazione. Per la rilevazione delle lesioni polmonari è stato utilizzato il metodo di Ostanello et al. (2007), basato sulla percentuale di area polmonare con lesione per ciascun lobo. Le ulcere della porzione esofagea dello stomaco (OGU) sono state invece classificate con la scala a 3 punteggi di Robertson et al. (2002).

Analisi statistica

Per l'analisi dei parametri ematici, i valori che si discostavano dalla media di più di tre deviazioni standard, sono stati considerati *outliers* ed eliminati secondo quanto suggerito dalla *International Federation of Clinical Chemistry* (Solberg, 1987). Le variabili sono state analizzate con la PROC UNIVARIATE (SAS 9.2, SAS Institute Inc.) per valutarne la distribuzione normale e trasformate in logaritmo in caso di negatività. Per l'analisi statistica è stata utilizzata una PROC MIXED per misurazioni ripetute. Il modello considerava come effetti fissi la caudotomia, la paglia, il sesso e l'età di osservazione, oltre alle interazioni. Allo stesso modo sono stati trattati i dati relativi al comportamento, precedentemente trasformati in frequenze. A causa della fornitura di paglia solo alla metà dei box, due variabili aggiuntive sono state create: la prima per la valutazione del comportamento esplorativo globale nei confronti di tutti gli arricchimenti presenti nel box; la seconda per il comportamento esplorativo globale verso gli arricchimenti diversi dalla paglia. Per quanto riguarda le lesioni sono stati osservati solo punteggi bassi. Per questo motivo, la variabile è stata considerata binomiale ed elaborata come presenza/assenza. Allo stesso modo, anche i punteggi relativi alle OGU ed alle lesioni polmonari sono state considerate come binomiali.

RISULTATI

Le interazioni tra i tre effetti fissi hanno mostrato poche significatività e sono state riportate solo nel testo e non in tabella. Per quanto riguarda i parametri sanitari, durante il ciclo di ingrasso sono morti 12 suini, equamente distribuiti nelle tesi sperimentali e per cause non imputabili a lesioni alle code.

I risultati inerenti i parametri ematici sono riportati in Tabella 3. I soggetti con coda hanno evidenziato livelli significativamente inferiori di cortisolo ematico rispetto ai soggetti

caudectomizzati ($P < 0,001$). A livello comportamentale hanno invece manifestato una minore frequenza di riposo (comportamento inattivo) e una maggiore frequenza di conflitti (Tabella 4). La presenza della coda è risultata un fattore di rischio per comportamenti di morsicatura sia alla coda (settimana 3: OR=0,31, $P < 0,001$; settimana 9: OR=0,41, $P = 0,01$) sia alle orecchie (settimana 3: OR= 0,81, $P = 0,01$; settimana 9: OR=0,67, $P < 0,001$) nella prima parte del ciclo di ingrasso, ma si è dimostrata protettiva per lo sviluppo di lesioni alla coda nelle settimane successive dell'ingrasso (settimana 14: OR=2,08, $P = 0,01$). La presenza di paglia come arricchimento ambientale ha abbassato significativamente i livelli di Hp in particolare nei soggetti non caudotomizzati (interazione caudotomia × paglia, $P < 0,05$). La presenza di paglia inoltre ha modificato significativamente la maggior parte dei comportamenti (Tabella 4), aumentando la motivazione ad esplorare tutti gli arricchimenti ambientali disponibili, soprattutto nei suini non caudotomizzati (interazione caudotomia × paglia, $P < 0,05$).

Il rischio di morsicature alla coda e alle orecchie è stato maggiore nei maschi (rispettivamente settimana 3: OR=2,27; settimana 9: OR=1,70). La paglia ha diminuito il rischio di morsicature sia alla coda sia alle orecchie (rispettivamente settimana 3, 9, 18 e settimana 3, 9) e si è dimostrata un fattore protettivo contro le lesioni alla coda nella settimana 3 (OR=2,12). Inoltre, la presenza di paglia è stata un fattore protettivo anche nei confronti delle OGU (OR=0,27), soprattutto negli animali non caudotomizzati (interazione caudotomia × paglia, OR=0,14). Nessuna significatività invece è stata evidenziata per quanto riguarda le lesioni polmonari.

Tabella 3. Effetto di caudotomia, presenza di paglia e sesso sui parametri fisiologici di suini in fase di ingrasso.

Table 3. Effect of gender, provision of straw and presence of tail on physiological parameters in fattening pigs.

Parametri ematici	Caudotomia		Paglia		Sesso		SEM	P-value			
	Si	No	Si	No	♂	♀		Coda	Paglia	Sesso	Settimana
Proteine totali, g/L	64,1	64,0	64,1	64,1	63,3	64,9	0,28	0,82	0,84	<0,001	<0,001
Albumina, g/L	28,2	27,6	27,9	27,8	27,4	28,4	0,34	0,23	0,88	0,07	<0,001
Globuline, g/L	35,9	36,2	35,9	35,9	35,5	36,2	1,01	0,54	0,96	0,47	<0,001
Albumina/Globuline	0,80	0,77	0,78	0,79	0,78	0,79	0,02	0,35	0,83	0,75	<0,001
Aptoglobina, mg/dL	62,9	64,8	54,2	73,5	46,8	80,9	1,07	0,61	<0,001	<0,001	<0,001
TAS, nmol/L	0,75	0,74	0,75	0,74	0,76	0,74	0,01	0,38	0,59	0,04	<0,001
Cortisolo, nmol/L	66,0	55,2	56,8	64,1	58,0	62,8	1,05	0,02	0,1	0,30	<0,001

Tabella 4. Effetto di caudotomia, presenza di paglia e sesso sul comportamento di suini in fase di ingrasso.

Table 4. Effect of gender, provision of straw and presence of tail on behaviour of fattening pigs.

Comportamento	Caudotomia		Paglia		Sesso		SEM	P-value			
	Sì	No	Sì	No	♂	♀		Coda	Paglia	Sesso	Settimana
Riposo	53,3	48,6	47,1	55,0	51,1	51,1	1,2	<0,001	<0,001	0,98	<0,001
Segatura	5,1	4,7	3,7	6,5	4,8	5,1	1,1	0,59	<0,001	0,73	<0,001
Catene	2,9	3,2	2,4	3,8	3,3	2,8	1,1	0,24	<0,001	0,13	<0,001
Catene gommate	2,6	2,7	2,2	3,2	2,9	2,4	1,1	0,62	0,03	0,12	<0,001
Tutti gli arricchimenti	17,3	19,7	23,8	13,9	19,3	18,3	0,8	0,17	<0,001	0,41	<0,001
Arricchimenti tranne paglia	8,5	7,6	7,5	13,8	11,0	10,3	1,1	0,38	<0,001	0,32	<0,001
Abbeveratoio	1,43	1,36	1,40	1,38	1,39	1,40	1,0	0,42	0,80	0,97	<0,001
Conflitti	1,8	2,1	2,0	1,9	2,0	2,0	1,1	0,03	0,54	0,92	<0,001

DISCUSSIONE

L'obiettivo dello studio era la verifica del possibile aumento dell'aggressività e delle lesioni in gruppi di suini pesanti non caudotomizzati, soprattutto nella fase finale del ciclo di ingrasso. La probabilità che si verificassero tali problematiche poteva essere supportata dal raggiungimento della maturità sessuale delle femmine, con conseguente rischio di maggiori interazioni agonistiche e dalla presenza di animali di peso superiore alla media delle produzioni europee con progressiva riduzione dello spazio disponibile per capo seppur entro limiti di legge (D. Lgs. 7 luglio 2011, n°122). Tuttavia, i risultati hanno evidenziato il momento critico per le lesioni alla coda nella prima parte del ciclo di ingrasso, fino alla settimana 14. Le lesioni alla coda infatti, si sono manifestate alla settimana 14 e, contrariamente alle aspettative, sono risultate significativamente più frequenti nei suini caudotomizzati con un conseguente aumento del cortisolo ematico. Tuttavia, questo gruppo sperimentale fino alla settimana 9 ha mostrato una minor frequenza di conflitti rispetto a quelli non caudotomizzati. In questo caso dunque, l'attività, i conflitti e le morsicature manifestate dai suini non caudotomizzati potrebbero essere considerate espressione di interazioni sociali, come suggerito da Day et al. (1995). Per i suini caudotomizzati, l'insorgenza di lesioni senza precedente espressione di un comportamento di morsicatura della coda poteva essere invece correlato ad un comportamento aggressivo con l'intento di causare un danno (Widowski et al., 2003). Sulla base dei risultati è possibile ipotizzare che i soggetti con la coda e senza coda mostrassero differente motivazione verso la coda dei conspecifici, ovvero nei primi maggiormente un'interazione sociale senza conseguenze traumatiche.

A manifestare elementi positivi di benessere sono stati i suini non caudotomizzati che avevano a disposizione la paglia: i parametri ematici, che nei soggetti a coda intatta avevano già mostrato una riduzione del cortisolo, hanno evidenziato in presenza di paglia

anche una riduzione del livello di Hp. Inoltre, la paglia ne ha incrementato le attività esplorative, consentendo agli animali di esprimere maggiormente i comportamenti specie-specifici (Van de Weerd e Day, 2009). La sua disponibilità continua nel dispenser la possibilità di mantenerla pulita e la sua frequente ricollocazione sono stati probabilmente i fattori maggiormente attrattivi per i suini (Hunter et al., 2001; Moinard et al., 2003), oltre alle caratteristiche insite del substrato che consente la masticazione e la distruzione da parte del suino (Van de Weerd et al., 2005). Questi fattori, come precedentemente osservato anche da Scott et al. (2006), hanno permesso di mantenere elevato l'interesse degli animali per la paglia anche nel tempo a differenza di tutti gli altri arricchimenti ambientali presenti. Tuttavia, sebbene la paglia si riconfermi uno tra i migliori arricchimenti ambientali ed abbia contribuito sensibilmente alla riduzione delle lesioni alla coda all'inizio del ciclo di ingrasso (settimana 3), la sua fornitura non ha evidenziato differenze significative tra gruppi per quanto riguarda l'insorgenza di lesioni alla fine del ciclo. Tutti le tesi sperimentali infatti hanno manifestato un declino delle morsicature che probabilmente va imputato ad una condizione normalmente riscontrabile nella fase finale dell'allevamento del suino pesante (Van de Weerd et al., 2005). Non va però tralasciato l'importante ruolo ricoperto dalla paglia nel diminuire il rischio di OGU al macello, dimostrandosi un forte fattore protettivo grazie alla stimolazione di una continua masticazione, salivazione ed ingestione di piccole quantità di fibra (Scott et al., 2007).

Ulteriori dettagli sui risultati e sulla discussione della presente prova sono riportati da Scollo et al. (2013) e Di Martino et al. (2013).

I risultati non evidenziano particolari difformità per quanto riguarda la morsicatura alla coda tra il suino pesante italiano e il suino leggero, questo anche in relazione al fatto che l'insorgenza del fenomeno è stata limitata alla prima metà dell'ingrasso. Nel corso della prova, l'associazione tra pavimentazione solo parzialmente fessurata, il rispetto delle norme minime per la protezione dei suini stabilite dalla legislazione vigente e la presenza di catene e segatura come arricchimenti ambientali ha reso possibile l'effettuazione di un ciclo produttivo del suino pesante non caudotomizzato. Tuttavia, a causa della multifattorialità dell'insorgere del fenomeno, sono necessari ulteriori studi condotti su questa categoria di animali per confermare i presenti risultati e incrementare le conoscenze del problema.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Regione del Veneto "Direzione Prevenzione U.C. Sanità Animale e Igiene Alimentare" (DGRV 2967/09) per aver promosso e finanziato il progetto di ricerca.

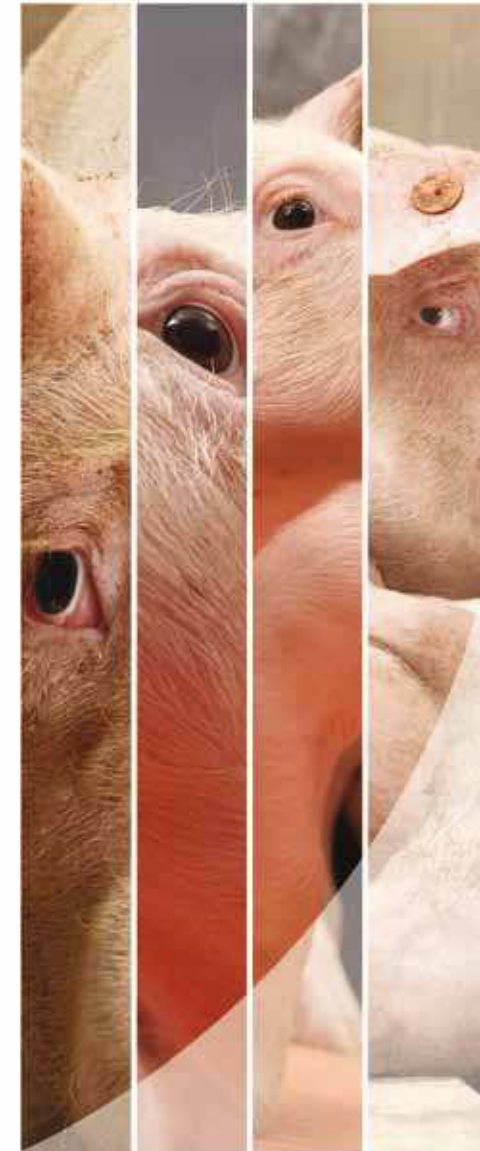
BIBLIOGRAFIA

- Busch, M.E., Wachmann, H., Nielsen, E.O., Petersen, H.H. and Nielsen J.P., 2004. Tail biting – can routine meat inspection data be used for classification of herds? Proceedings IPVS 2004, 788.
- EFSA, 2007. Scientific Report on the risk associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need to tail docking considering the different housing and husbandry systems. The EFSA Journal 611:4-13.
- Elbers, A.R.W., Tielen, M.J.M., Snijders, J.M.A., Cromwijk, W.A.J. and Hunneman, W.A., 1992. Epidemiologic studies on lesions in finishing pigs in The Netherlands. I. Prevalence, seasonality and interrelationship. Preventive Veterinary Medicine, 14, 217-231.

- Holmgren, N., Lundeheim, N., 2004. Risk factors for tail biting. Proceedings of the 18th IPVS Congress, 27/06 – 1/07/2004, Hamborg, Tyskland: 786.
- McIntyre, J., 2003. Tail Biting in pigs. PhD, University of Newcastle, UK.
- Moinard, C., Mendl, M., Nicol, C.J., Green, L.E., 2003. A case control study of on-farm risk factors for tail biting in pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 81, 333–355.
- Paul, E.S., Moinard, C., Green, L.E., Mendl, M., 2007. Farmers' attitudes to methods for controlling tail biting in pigs. *Veterinary Record* 160, 803–805.
- Robert, S., Matte, J.J. and Girard, C.L., 1991. Effect of feeding regimen on behaviour of growing-finishing pigs supplemented or not supplemented with folic acid. *J. Anim. Sci.*, 69, 4428-4436.
- Rushen, J., 1985. Stereotypies, aggression and the feeding schedules of tethered sows. *Appl. Anim. Behave. Sci.*, 14, 137-147.
- Smulders, D., Hautekiet, V., Verbeke, G., Geerst, R., 2008. Tail and ear biting lesions in pigs: an epidemiological study. *Animal Welfare* 17,61-69.
- Taylor N. R., R. M. A. Parker, M. Mendl, S. A. Edwards, D. C. J. Main, 2012. Prevalence of risk factors for tail biting on commercial farms and intervention strategies. *The Veterinary Journal* 194,77-83.
- Terlouw, E.M., Lawrence, A.B., Koolhaas, J.M., Cockram, M., 1993. Relationship between feeding, stereotypies, and plasma glucose concentrations in food restricted and restrained sows. *Physiology and Behavior* 54, 189–193.
- Tiilikainen, M., 2000. Neljä viidestä porsastuottajasta tuottaa virheettomia porsaita. Laatuvirheistä pahin on purtu hanta. *Maatilan Pellervo*, 1, 22-24.
- Day, J.E.L., Kyriazakis, I., Lawrence, A.B., 1995. The effect of food-deprivation on the expression of foraging and exploratory behaviour in the growing pig. *Applied Animal Behavioural Science* 42, 193-206.
- Martin, P., Bateson, P., 2007. *Measuring Behaviour, an introductory guide*. 3th ed. Cambridge University Press, UK.
- Moinard, C., Mendl, M., Nicol, C.J., Green, L.E., 2003. A case control study of on-farm risk factors for tail biting in pigs. *Applied Animal Behavioural Science* 81, 333-355.
- Scott, K., Taylor, L., Gill, B.P., Edwards, S.A., 2006. Influence of different types of environmental enrichment on the behaviour of finishing pigs housing in two different systems 1. Hanging toy versus rootable substrate. *Applied Animal Behavioural Science* 99, 222-229.
- Solberg, H.E., 1987. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta* 170, S13-S32.
- Sutherland, M.A., Bryer, P.J., Krebs, N., McGlone, J.J., 2008. Tail docking in pigs: acute physiological and behavioural responses. *Animal* 2, 292-297.
- Van de Weerd, H.A., Day, J.E.L., 2009. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Applied Animal Behavioural Science* 116, 1-20.
- Van de Weerd, H.A., Docking, C.M., Day, J.E.L., Edwards, S.A., 2005. The development of harmful social behaviour in pigs with intact tails and different enrichment backgrounds in two housing systems. *Journal of Animal Science* 80, 289-298.
- Widowski, T.M., Cottrell, T., Dewey, C.E., Friendship, R.M., 2003. Observations of piglet-directed behaviour patterns and skin lesions in eleven commercial swine herds. *Journal of Swine Health and Production* 11, 181-185.
- Ostanello, F., Dottori, M., Gusmara, C., Leotti, G., Sala, V., 2007. Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. *Journal of Veterinary Medicine* 54, 70-75.
- Robertson, I.D., Accioly, J.M., Moore, K.M., Driesen, S.J., Pethick, D.W. Hampson, D.J., 2002. Risk factors for gastric ulcers in Australian pigs at slaughter. *Preventive Veterinary Medicine* 53, 293-303.
- Scollo, A., Di Martino G., Bonfanti, L., Stefani, A.L., Schiavon, E., Marangon, S., Gottardo, F., 2013. Effect of gender and straw provision on the welfare of undocked heavy pigs: skin lesions, behaviour and physiological parameters. *Research in Veterinary Science* 95, 825–830.
- Di Martino, G.; Capello, K.; Scollo, A.; Gottardo, F.; Stefani, A. L.; Rampin, F.; Schiavon, E.; Marangon, S.; Bonfanti, L. 2013. Continuous straw provision reduces prevalence of oesophago-gastric ulcer in pigs slaughtered at 170 kg (heavy pigs). *Research in Veterinary Science* 95, 1271–1273.

HUVEPHARMA

We add performance to your business



Huvepharma AD
5th Floor, 39 Nikolay Haytov Str.
1113 Sofia, **Bulgaria**
Tel.: +359 2 862-5331
Fax: +359 2 862-5334
e-mail: sales@huvepharma.com

Huvepharma NV
Uitbreidingstraat 80
2600 Antwerp, **Belgium**
Tel.: +32 3 288 1849
Fax: +32 3 289 7845
e-mail: customerservice@huvepharma.com

Contatti per l'Italia:
gabriele.festi@huvepharma.com
paolo.mondin@huvepharma.com

**massima
protezione**



**perfetta
miscelazione**

Più spazio per una facile miscelazione

Chiedi al tuo veterinario



www.izo.it



**IZO da oltre quarant'anni produce farmaci e vaccini ad uso veterinario.
Nasce così una gamma di prodotti altamente affidabili
in grado di garantire, insieme alla professionalità dei medici Veterinari e
la cura degli allevatori, il benessere assoluto degli animali da reddito.**

Per IZO la ricerca della qualità è una qualità rara.

Vaccino Merial
contro il **circovirus**



Un'ampia gamma di vantaggi



vaccino Merial
per **SCIOFFE & SUINETTI** CONTRO IL PCV2



Chiedi al tuo Veterinario!

- Efficace nel controllo del PCV2 e nel miglioramento della REDDITIVITÀ aziendale^{1,2}
- Migliora lo STATO SANITARIO e le performance di CRESCITA nei magroni e nei suini da ingrasso^{2,3}
- Ripristina l'OMOGENEITÀ del peso alla macellazione^{1,4,5}
- Riduce il tasso di MORTALITÀ dallo svezzamento al macello^{1,2}

1. JAVAS LIFE MARK - Illustration: © JAVAS COMPANY



MSD

Animal Health



**La Scienza
per animali più Sani**



1. Quastan F, et al. Proceedings of the 3rd ESPHM, Espoo, Finland, 2011, p 157. 2. Pejak, et al. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2010, 33: e1-e5. 3. Chevalier M, et al. Proceedings of 22nd IPVS Congress, Jeju, Korea, 2012, vol 2, p 888. 4. Ono, et al. Proceedings of the 5th APVS Congress, Pattaya, Thailand, 2011, 072. 5. Vila, et al. Abstract book of the 4th ESPHM Congress, Bruges, Belgium, 2012, p 102.



Ci prendiamo cura dei vostri animali da reddito come fossero i nostri.

La redditività di un moderno allevamento zootecnico dipende in larga misura dalla salute e dal benessere degli animali.

Per questo Novartis Animal Health, società multinazionale del settore farmaceutico, è impegnata da anni a ricercare, sviluppare e commercializzare prodotti veterinari in grado di combattere le più importanti patologie, ed assicurare ai vostri animali da reddito un ambiente di vita più salubre. Come fossero i nostri.

 **NOVARTIS**
ANIMAL HEALTH

Large U. Boccioni, 1 - 21040 Origgio (Va)
www.saluteanimale.novartis.it
Servizio Tecnico 02.96542537



INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI ANIMAL HEALTH PRODUCT



> RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.


Dry Protection System

Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfere da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

INDUSTRIA ITALIANA
INTEGRATORI TREI S.p.A.

AMMINISTRAZIONE
E STABILIMENTO
ADMIN. AND PRODUCTION PLANT
Via Alfarsosa 4
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:
+39 0522 640711

FAX:
+39 0522 649757
+39 0522 640716

info@treivet.com
www.treivet.com

NON LASCIAMO CHE GLI ALLEVAMENTI ITALIANI
DIVENTINO SOLO UN RICORDO.



zoetis

