

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
PRODUZIONI ANIMALI, BIOTECNOLOGIE VETERINARIE,
QUALITÁ E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI**

CICLO XXVI

**LA MALATTIA DI AUJESZKY: STUDIO DELL'IMPATTO
ZOOTECNICO E PERFEZIONAMENTO DI METODICHE
MOLECOLARI E SIEROLOGICHE PER LA VALUTAZIONE
DELL'INFEZIONE**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Paola Superchi**

**Tutor:
Chiar.mo Prof. Paola Superchi**

Dottorando: Dott. Marcello Bresaola

RIASSUNTO

La malattia di Aujeszky, o Pseudorabbia, è un patologia infettiva a diffusione mondiale sostenuta da *Swine-Herpesvirus-1* (SHV-1). Colpisce numerose specie animali, sia domestiche che selvatiche, causando un'encefalite acuta che evolve con la morte dei soggetti colpiti. L'unica eccezione a questo esito infausto è rappresentata dal suino, che costituisce perciò l'ospite primario e serbatoio di contagio del virus. La sintomatologia nella specie suina è strettamente legata all'età dell'individuo colpito. Le manifestazioni cliniche della malattia e le sue caratteristiche epidemiologiche la rendono una delle patologie di maggior impatto dell'allevamento suino.

In tutti i Paesi a suinicoltura avanzata, a seguito delle elevate perdite economiche che la Pseudorabbia determina, sono stati impostati piani di controllo che in molti casi hanno portato all'eradicazione della malattia stessa, come ad esempio in Germania, Francia e Olanda. In Italia, nonostante la presenza di un programma vaccinale obbligatorio, la prevalenza di SHV-1 negli allevamenti di suini rimane ancora molto elevata.

Di seguito verranno analizzati degli aspetti riguardanti la malattia di Aujeszky, alcuni legati alle tecniche diagnostiche di laboratorio e altri inerenti l'infezione da SHV-1 nel suino. Infine verrà preso in esame l'impatto zootecnico della Pseudorabbia in un allevamento di suini a ciclo chiuso.

ABSTRACT

Aujeszky's disease, also known as Pseudorabies, is a worldwide-spread infectious disease caused by *Swine-Herpesvirus-1* (SHV -1). It affects many animal species both domestic and wild by causing a deadly form of acute encephalitis. The only species exempt from this course is the pig, the virus primary host and reservoir. The symptoms in swine is closely related to the age of the subject affected. The disease's clinical manifestations and its epidemiological pattern cause it to heavily impact the sector of pig farming. In all countries where pigs are raised intensively (such as, for instance, Germany, France, and The Netherlands) and following the losses that Pseudorabies causes, plans have been implemented which in most cases led to its eradication. In spite of the presence of a mandatory vaccination plan, SHV-1 occurrence on Italian soil is still very frequent.

In the following thesis some aspects of Aujeszky's disease will be analyzed in reference both to laboratory techniques and SHV-1 infection in swine. Finally, we will consider the impact of Pseudorabies in a farrow to finish pig herd.

INDICE

1. Introduzione.....	pag.6
2. La Malattia di Aujeszky	
2.1. Eziologia.....	pag.10
2.2. Patogenesi.....	pag.10
2.3. Sintomatologia.....	pag.11
2.4. Lesioni anatomo patologiche.....	pag.12
2.5. Diagnosi.....	pag.13
2.6. Profilassi.....	pag.14
3. Indagini personali	
3.1. Confronto di due real time PCR per la diagnosi della Malattia di Aujeszky	
3.1.1. Introduzione.....	pag.16
3.1.2. Materiali e Metodi.....	pag.16
3.1.3. Risultati e Discussione.....	pag.19
3.2. Indagini sierologiche e virologiche in un allevamento indenne da Malattia di Aujeszky con sporadiche positività per la glicoproteina E	
3.2.1. Introduzione.....	pag.22
3.2.2. Materiali e Metodi.....	pag.23
3.2.3. Risultati e Discussione.....	pag.24
3.3. Indagini sierologiche e virologiche al macello: ricerca del virus latente della Malattia di Aujeszky nel Sistema Nervoso Centrale	
3.3.1. Introduzione.....	pag.26
3.3.2. Materiali e Metodi.....	pag.26
3.3.3. Risultati e Discussione.....	pag.26

3.4. Valutazione dell'impatto zootecnico e dell'incidenza economica della Malattia di Aujeszky in un allevamento di suini a ciclo chiuso	
3.4.1. Introduzione	pag.29
3.4.2. Materiali e Metodi	pag.29
3.4.3. Risultati e discussione	pag.31
4. Conclusioni	pag.36
Bibliografia	pag. 38

1. INTRODUZIONE

La malattia di Aujeszky, o Pseudorabbia, è una patologia infettiva sostenuta dal *Swine-herpesvirus-1* (SHV-1). Il suino è l'ospite naturale del virus e solo in questa specie la malattia ha carattere contagioso e rilevanza sanitaria ed economica. I quadri clinici sono differenti a seconda dell'età dell'animale colpito: encefalite acuta nei giovani, sindrome respiratoria negli adulti e ipofertilità ed aborto nei riproduttori. Frequenti sono le forme sub-cliniche e le infezioni latenti. La Pseudorabbia può colpire molti altri mammiferi oltre il suino, sia domestici che selvatici. Tali animali sono considerati dei "fondi epidemiologici ciechi" non essendo in grado di trasmettere il virus e l'unica forma con cui la malattia si manifesta è una encefalite acuta con esito costantemente mortale; inoltre non sono state dimostrate infezioni latenti e/o subcliniche.

La malattia fu osservata e descritta per la prima volta nel 1813 nel bestiame allevato negli Stati Uniti. Gli animali colpiti manifestavano un prurito estremo, da qui il nome di "mad itch", ossia prurito furioso (Baskerville et al. 1973). Il nome Pseudorabbia venne utilizzato per la prima volta nel 1849 in Svizzera poiché i segni clinici manifestati dal bestiame erano molto simili a quelli della rabbia. Nel 1902 Aujeszky, medico veterinario ungherese, stabilì come di origine non batterica l'agente eziologico, e nel 1910 con esperimenti di filtrazione confermò che l'agente era di tipo virale. Sabin e Wright nel 1934 identificarono il virus come un Herpesvirus, immunologicamente collegato all'Herpes simplex (Wittmann, Rziha, 1989). A partire dal dopoguerra la malattia di Aujeszky, prima limitata a casi sporadici e spesso poco chiari, divenne una patologia importante ed economicamente rilevante dell'allevamento suino. Sono state postulate alcune ragioni per l'apparente aumento di severità della malattia, della prevalenza e della distribuzione. Si pensa sia alla comparsa di ceppi più virulenti, sia al radicale cambiamento del management suino e l'avvento di un sistema di allevamento intensivo che hanno facilitato il mantenimento e la diffusione dell'agente eziologico.

La Pseudorabbia è una malattia a diffusione mondiale ed ogni anno produce enormi

perdite economiche nel settore porcino, in particolare in quei paesi dove la suinicoltura è di tipo altamente industrializzato. Non a caso in tutti questi Paesi l'eradicazione della malattia è un obiettivo primario (obiettivo ad oggi già raggiunto in molti paesi quali ad esempio Gran Bretagna, Danimarca, Germania). Molte sono le specie animali sensibili al virus ma l'unica importante dal punto di vista epidemiologico è quella suina. Il maiale è dunque da ritenere l'unica fonte d'infezione, anche per gli altri mammiferi che si comportano sempre e invariabilmente come fondi ciechi epidemiologici (per questo definiti ospiti aberranti) (Beran, 1991). L'infezione da SHV-1 è altamente contagiosa e la via di trasmissione di maggior rilievo è quella orizzontale diretta mediante le secrezioni nasali. In aree a spiccata vocazione suinicola è stata dimostrata che oltre alla trasmissione diretta, fra animali che vivono a stretto contatto e quindi dello stesso allevamento, si può sommare la trasmissione indiretta per via aerogena fra allevamenti contigui. Questa diffusione a distanza è stimata in condizioni normali fra un massimo di 500 mt. e 1 Km. In particolari condizioni di temperatura, umidità e correnti d'aria favorevoli però può arrivare sino a 40 Km, dato sicuramente estremo ma nello stesso tempo significativo e in grado di spiegare la comparsa di focolai altrimenti ingiustificabili (Christensen et al. 1990). Se la via respiratoria è senza dubbio la via preferita dal virus, la trasmissione può realizzarsi anche mediante altre "strade". Seme infetto (sia nella monta naturale che nell'inseminazione artificiale) e latte di scrofe infette sono materiali che rientrano sempre nelle possibilità di trasmissione orizzontale diretta del virus, mentre per quella orizzontale indiretta ricordiamo come possibili veicoli dell'agente eziologico il mangime, l'acqua di abbeveraggio e tutto il materiale potenzialmente contaminato come siringhe, stivali, etc. Accanto alla via orizzontale non va poi dimenticata la via verticale e quindi alla possibilità di trasmissione transplacentare e perinatale (durante il passaggio nel canale del parto) (Beran, 1991). In conclusione il SHV-1 predilige sicuramente la via aerogena diretta per la sua diffusione ed è questa che nell'allevamento infetto assume importanza da un punto di vista epidemiologico. D'altra parte non si possono ignorare le altre molteplici potenziali vie se si vuole controllare la

malattia sia nell'allevamento come entità singola sia come unità inserita in un contesto territoriale a vocazione suinicola. Per terminare quanto riguarda l'epidemiologia del SHV-1, trattandosi di un Herpesvirus, non possiamo non menzionare il fenomeno della latenza. Prerogativa degli Herpes è infatti la proprietà di fuggire al sistema immunitario dell'ospite risalendo le fibre nervose fino ai gangli del trigemino. Qui vi rimangono generando così quella che è chiamata infezione latente, cioè una fase di persistenza del virus nell'ospite non associata a replicazione virale. In occasione di immunodepressione del portatore l'infezione latente può riattivarsi con conseguente moltiplicazione ed escrezione virale (Mettenleiter, 1991). È tuttavia opinione comune, secondo gli esperti, che la riattivazione del virus non giochi un ruolo importante nell'epidemiologia della malattia. Rappresentano fonti sicuramente più insidiose d'infezione i cosiddetti suini convalescenti e malati cronici (Maes et al. 1997).

La malattia di Aujeszky rappresenta una delle patologie di maggior impatto nella suinicoltura, sia per le manifestazioni cliniche che per le caratteristiche epidemiologiche, di diffusione e d' infezione. La problematica clinica che oggi giorno consegue all'infezione da SHV-1 si caratterizza non tanto per disturbi nervosi tipici dei soggetti neonati, quanto per il ruolo esercitato dal virus nel determinismo delle malattie respiratorie dei soggetti in accrescimento/ingrasso e come patogeno della sfera riproduttiva. Molti Paesi a suinicoltura avanzata hanno riconosciuto la necessità di impostare strategie di controllo ed eradicazione della Pseudorabbia a causa dell'elevato impatto economico che essa determina. L'attuale piano nazionale di controllo della malattia di Aujeszky ha come base giuridica il Decreto del Ministero della Salute del 1° Aprile 1997, successivamente modificato dal Decreto del Ministero della Salute del 30 Dicembre del 2010.

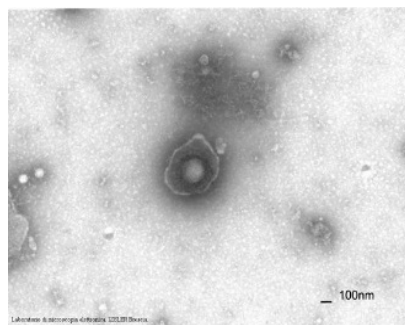
Questa Tesi di Dottorato nasce dalla volontà di approfondire alcuni degli aspetti più "critici" della Pseudorabbia. In primo luogo verranno esaminate alcune metodiche di tipo laboratoristico, sviluppate presso il Laboratorio di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). L'efficienza degli strumenti

diagnostici a disposizione del Medico Veterinario rappresenta infatti uno strumento indispensabile per una diagnosi tempestiva e corretta. Successivamente sarà dedicata una parte del lavoro alla verifica della prevalenza di SHV-1 negli allevamenti di suini italiani attraverso un monitoraggio al macello. Ed infine sarà trattato l'aspetto più prettamente zootecnico della malattia di Aujeszky, ovvero quanto questa malattia possa influire negativamente sulla produttività di un'azienda suinicola e quindi sulla sua redditività.

2. La Malattia di Aujeszky

2.1. Etiologia

Il SHV-1 appartiene alla famiglia delle *Herpesviridae*, sottofamiglia *Alphaherpesviridae* (Mettenleiter, 2000). Come gli altri alphavirus presenta un ciclo di replicazione litica di breve durata (ventiquattro ore massimo) e la capacità di sostenere infezioni latenti, con localizzazione del virus



SHV-1 foto microscopia elettronica da Galleria Fotografica www.izsler.it

a livello dei gangli nervosi sensoriali (trigemino). Il genoma è costituito da una unica molecola lineare di DNA bicatenario. È un virus a simmetria icosaedrica e provvisto di envelope. Relativamente al profilo antigenico del SHV-1 ad oggi sono state identificate undici glicoproteine differenti classificate in due grandi gruppi: “Essenziali” e “Non Essenziali” (Nauwynck, 1997). Le Essenziali intervengono nella replicazione del virus, come ad esempio la gB, mentre le Non Essenziali, come la gE, non rivestono un ruolo fondamentale in questo processo (questa caratteristica delle glicoproteine Non Essenziali è fondamentale nella realizzazione dei vaccini deleti di cui si parlerà successivamente) (Nauwynck 1997). SHV-1 è relativamente stabile alle alte temperature (5h a 44°C e 1 min. a 100°C) e in ambienti contaminati può persistere per alcune settimane.

2.2. Patogenesi

L'infezione avviene prevalentemente per via endonasale, anche se possibili vie di ingresso sono quella orale, vaginale e transplacentare. La replicazione primaria si compie a livello della mucosa oronasale e delle tonsille. Successivamente il virus invade il SNC per via neurogena, ed infetta i macrofagi ed i linfociti con conseguente viremia cellulo-mediata (Nauwynck, Pensaert, 1995). Il bersaglio d'elezione rappresentato dai macrofagi alveolari con conseguente alterazione della loro funzionalità. In particolare il

SHV-1 impedisce la formazione del fagolisosoma compromettendo di fatto il ruolo di “sentinelle” e “spazzini” dei macrofagi stessi a livello polmonare. Ecco perché il virus è considerato un patogeno primario, di per se non capace di portare a malattia grave e mortale l’animale, ma in grado di rendere inoffensive le difese locali a vantaggio di patogeni secondari più aggressivi. Il virus presenta forte tropismo anche per le cellule del SNC (Pensaert, Kluge, 1989). I meccanismi molecolari che consentono al SHV-1 di entrare nelle cellule nervose non sono stati ancora del tutto stati chiariti. Ben nota è invece la capacità di SHV-1 di superare la barriera placentare in associazione ai leucociti, con conseguenti manifestazioni cliniche riconducibili alla sindrome SMEDIA delle scrofe. Va ricordato che l’evoluzione dell’infezione, e quindi anche la patogenesi, è condizionata da diversi fattori: virulenza dell’ospite, dose infettante e via d’infezione.

2.3. Sintomatologia

Nella specie suina la forma clinica dipende in maniera determinante dall’età dell’animale colpito. Si distinguono tre forme principali: nervosa, respiratoria e riproduttiva (Kluge et al. 1999).

Forma nervosa: tipica dei giovani suinetti entrati in contatto con il virus di campo prima del sessantesimo giorno di vita, sprovvisti di immunità colostrale e con un sistema immunitario non ancora in grado di fornire un’adeguata protezione. È senza dubbio la forma più grave ed eclatante nelle sue manifestazioni. I sintomi neurologici possono manifestarsi già entro le prime 24 h di vita con tremori, scialorrea, atassia, opistotono e gravi crisi convulsive. Se colpiti entro il ventesimo giorno di vita la mortalità è prossima al 100%, si riduce ma solo lievemente se l’infezione avviene dai venti ai sessanta giorni. È una forma clinica che oggi difficilmente si riscontra negli allevamenti essendo i riproduttori vaccinati e quindi i suinetti protetti da una buona immunità passiva colostrale (Kritas et al. 1997).

Forma respiratoria: tipica dei soggetti già svezzati, magroni e grassi. Il periodo di

incubazione è di due-sei giorni mentre la sintomatologia si manifesta per cinque-dieci giorni. L'alterazione della funzionalità macrofagica provoca un calo delle difese locali e manifestazioni cliniche quali rinite, starnuti e scolo nasale. Se non sopraggiungono complicazioni l'animale sviluppa una buona e duratura immunità con esito favorevole della malattia. Non va comunque dimenticato il calo delle performance produttive dei suini colpiti durante la malattia (ritardo di accrescimento, calo degli indici produttivi, etc.). L'infezione di patogeni secondari a cui il SHV-1 può fare da apripista è invece un evento molto più negativo e non sottovalutabile, ricordiamo in particolare l'infezione da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kluge et al. 1999).

Forma riproduttiva: nella scrofa il SHV-1 rientra nel determinismo della sindrome SMEDIA. La manifestazione clinica tipica della malattia di Aujeszky nelle scrofe è l'aborto dal settantesimo al novantesimo giorno di gestazione. Tuttavia si possono anche verificare quadri di mummificazione fetale, più tipici della parvoviroosi, e quadri di aborto tardivo, più tipici della leptospirosi. Nel verro sono descritti rari casi di edema scrotale e azospermia parziale o totale (Kluge et al. 1999). L'immunità che si instaura in seguito alla malattia è buona e duratura, sia per l'immunità cellulo-mediata che per quella umorale. Gli anticorpi neutralizzanti sono efficaci nel neutralizzare il virus durante la fase di viremia. L'immunità non protegge nei confronti dell'aborto

2.4. Lesioni anatomo patologiche

La forma respiratoria è caratterizzata dalla flogosi della mucose delle prime vie respiratorie e dalla comparsa di ampi focolai polmonari di consolidazione, soprattutto a livello dei lobi craniali e del lobo cardiaco.



Lesioni da SHV-1 in polmone di suino
da Galleria Fotografica www.izsler.it

Nella forma nervosa le lesioni macroscopiche sono pressoché assenti o poco significative e si limitano all' iperemia delle meningi e all'aumento del liquido cefalo-rachidiano. Nelle scrofe l'aborto è seguito da una leggera flogosi della mucosa uterina che si presenta edematosa



Feto di suino abortito
da Galleria Fotografica www.izsler.it

(Kluge et al. 1999). I feti abortiti presentano edema sottocutaneo, necrosi epatica e splenica, focolai necrotici polmonari e tonsillari (Kluge, Mare 1976).

2.5. Diagnosi

La diagnosi di malattia di Aujeszky si basa su rilievi clinici che necessariamente devono essere integrati con indagine anamnestica, esami necroscopici e soprattutto esami di laboratorio.

Prove dirette: cercano di mettere in evidenza il virus mediante isolamento (organi di elezione sono il cervello, la milza e il polmone) su substrati cellulari e/o dimostrazione dell'antigene presente nei campioni. In questo ultimo caso si ricorre a test immunoenzimatici come ELISA e immunoperossidasi. Rientrano nelle prove dirette anche quelle che, attraverso reazioni di amplificazione del genoma, come la polymerase chain reaction (PCR), o impiego di sonde a DNA, si prefiggono di dimostrare la presenza del genoma virale. La prova biologica di solito è praticata sul coniglio mediante l'inoculazione del materiale in esame per via sottocutanea; in caso di positività il coniglio mostra prurito nel punto di inoculazione e morte dopo 48 h.

Prove indirette: svelano le reazioni immunitarie specifiche dell'ospite. Si utilizzano tecniche di sieroneutralizzazione, ELISA indiretta, immunofluorescenza indiretta. A fini diagnostici per dimostrare la sierconversione è indispensabile il doppio campione di sangue prelevato in fase acuta e convalescente (Toma et al. 2004).

2.6. Profilassi

Profilassi igienico-sanitaria: è il punto di partenza nel controllo e nella lotta di tutte le patologie di origine infettiva e dunque anche della Pseudorabbia.

Profilassi vaccinale: il ricorso all'utilizzo dei vaccini è ritenuto indispensabile per il controllo e per la lotta nei confronti della pseudorabbia. I vaccini per la profilassi della malattia di Aujeszky possono essere distinti in: inattivati, inattivati a sub-unità, attenuati, deleti (questi ultimi attenuati o inattivati) e vaccini a DNA. Per delezione si intende l'eliminazione di uno o più antigeni virali, conseguente alla rimozione di una sequenza di DNA. In questo modo è possibile discriminare fra animali infetti e vaccinati (presupposto fondamentale per l'eradicazione della malattia). Ovviamente la delezione non può riguardare gli antigeni considerati indispensabili per la replicazione del virus (gB, gD, gH, gL), e neppure quelli considerati gli immunogeni più importanti (gD, gC) (Van Rooij et al. 2006). L'antigene che non presenta tutte queste caratteristiche è gE e tutti i vaccini oggi in commercio per la Pseudorabbia sono gE deleti. Gli esperti sono concordi inoltre nel ritenere i vaccini inattivati siano meno efficaci rispetto agli attenuati. Poiché i suini immunizzati con vaccini inattivati ed attenuati presentano, alla sieroneutralizzazione, simili titoli anticorpali, si ritiene che l'immunità cellulo-mediata svolga un ruolo protettivo importante. La minore efficacia dei vaccini inattivati è sicuramente da mettere in relazione alla loro minore capacità di stimolare la risposta cellulare, anche se resta ancora da chiarire la natura di questo deficit (Farina, Scatozza, 1998).

La malattia di Aujeszky rappresenta una delle patologie di maggior impatto nella suinicoltura, sia per le manifestazioni cliniche che per le caratteristiche epidemiologiche, di diffusione e d' infezione. La problematica clinica che oggi giorno consegue all'infezione da SHV-1 si caratterizza non tanto per disturbi nervosi tipici dei soggetti neonati, quanto per il ruolo esercitato dal virus nel determinismo delle malattie

respiratorie dei soggetti in accrescimento/ingrasso e come patogeno della sfera riproduttiva. Molti Paesi a suinicoltura avanzata hanno riconosciuto la necessità di impostare strategie di controllo ed eradicazione della Pseudorabbia a causa dell'elevato impatto economico che essa determina. L'attuale piano nazionale di controllo della malattia di Aujeszky ha come base giuridica il Decreto del Ministero della Salute del 1° Aprile 1997, successivamente modificato dal Decreto del Ministero della Salute del 30 Dicembre del 2010.

3. Indagini personali

3.1. Confronto di due real time PCR per la diagnosi della Malattia di Aujeszky

3.1.1. Introduzione

La vaccinazione dei suini per SHV-1 è considerata la principale strategia di controllo della malattia ed uno strumento indispensabile per giungere all'eradicazione. Inoltre l'utilizzo di vaccini marker (gE-deleti) rende la vaccinazione ancora più efficiente permettendo mediante test ELISA di differenziare gli animali vaccinati da quelli infetti. Come gli alphaherpesvirus umani, anche SHV-1 è in grado di infettare il tessuto nervoso dell'ospite naturale e di sopravvivere in questo per lungo tempo in forma latente. La riattivazione del virus latente può avvenire in concomitanza ad eventi stressogeni naturali e il suino sieronegativo torna ad essere una possibile fonte di contagio all'interno dell'allevamento. Lo scopo del presente lavoro è quello di confrontare le performance analitiche di due real time PCR descritte in letteratura e utilizzate per la rilevazione di DNA genomico di SHV-1 (gB e gE) in diversi organi di suino (Ma et al. 2008) (Yoon et al. 2005).

3.1.2. Materiali e Metodi

Campioni

Stock virali. Per la valutazione della sensibilità analitica delle due real time PCR sono state impiegate diluizioni in base 10 di due stock di SHV-1: il ceppo 252504 (titolo $10^{-7,6}$ TCID₅₀/50 μ l) isolato nel 2006 e il ceppo 54/84 (titolo $10^{-6,4}$ TCID₅₀/50 μ l) utilizzato come ceppo di riferimento dai laboratori dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) per la valutazione dell'efficacia della vaccinazione e la produzione di anticorpi monoclonali. Considerando il titolo dei due stock virali, sono state utilizzate diluizioni comprese tra 10^{-4} e 10^{-8} .

Materiali patologici positivi. Sono stati esaminati tonsille ed encefali di suini, di

età compresa tra i cinquanta e i sessanta giorni, infettati sperimentale presso le stalle di isolamento dell'IZSLER per la produzione di sieri di riferimento. Per l'infezione sono stati utilizzati il ceppo ADV 7519 (titolo 10-6,6 TCID₅₀/50µl) e il ceppo vaccinale Bucarest (titolo 10-6,5 TCID₅₀/50µl). Gli animali sono stati successivamente sacrificati a 5, 8, 11, 19 e 20 giorni post-infezione. Le tonsille dei suini sacrificati 5 giorni dopo l'infezione sono risultate positive per SHV-1 in immunofluorescenza, quelle del suino abbattuto 8 giorni post infezione debolmente positive e negative le tonsille degli altri animali. Dall'ottavo giorno post infezione gli animali hanno sierconvertito sia per gB che per gE. Infine sono stati utilizzati tre encefali, due di cane ed uno di bovino, ed un polmone di suino, conferiti alla sezione diagnostica dell'IZSLER e risultati positivi per SHV-1 all'isolamento virale in tessutocoltura.

Estrazione e purificazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto dalle diverse matrici utilizzando il kit Qiagen Mini Elute™ secondo le indicazioni del produttore. Il DNA è stato successivamente eluito in 40 µl di H₂O nuclease-free e conservato a -70°C fino all'utilizzo.

real time PCR

Sono stati impiegati due differenti protocolli di real time PCR, come descritto da Yoon et al, 2005 (a) e Ma et al, 2008 (b). Entrambi prevedono due reazioni di real time PCR, una per la ricerca di gB e una per la ricerca di gE. I due protocolli sono stati messi a punto al fine di rilevare la presenza di SHV-1 in differenti matrici (tessuto nervoso, tonsille, tamponi nasali), mediante la ricerca del genoma codificante per gB e di distinguere i ceppi di campo da quelli vaccinali, utilizzando primer specifici per gE. Di seguito vengono riportate in dettaglio le caratteristiche di reazione dei due protocolli di real time PCR. Per tutte le reazioni la soglia di

positività è stata fissata a 38 Ct (reazione positiva per Ct ≤ 38; negativa per Ct > 38).

real time PCR Yoon et al, 2005 (a)

Per entrambe le reazioni: Mix di reazione: 5 µl di DNA genomico, 12.5 µl di 2x TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystem), 2.5 µl per ciascun primer alla concentrazione finale di 900 nM e 2.5 µl di sonda (marcata 5'-FAM e 3'-TAMRA) alla concentrazione di 250 nM. Profilo termico: 95°C per 10 minuti, 50 cicli di 94°C per 1 minuto, 60°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto. Le sequenze dei primer sono riportate in Fig.1.

real time PCR Ma et al, 2008 (b)

Per entrambe le reazioni: Mix di reazione: 2.5 µl di DNA genomico, 12.5 µl di 2x TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0.5 µl per ciascun primer alla concentrazione finale di 20 µM e 0.2 µl di sonda (marcata 5' FAM e 3'-TAMRA), alla concentrazione finale di 25 µM. Profilo termico: 95°C per 10 minuti, 40 cicli di 94°C per 15 secondi e 62°C per 1 minuto. Le sequenze dei primer sono riportate in Fig.1.

Fig.1 Sequenza prime real time PCR (a) e (b)

PCR	target	primer
(a)	gB forward	5'-ACGGCACGGGCGTGATC-3'
	gB reverse	5'-ACTCGCGGTCCCTCCAGCA-3'
	gB probe	5'-CTCGCGCGACCTCATCGAGCCCTGCAC-3'
	gE forward	5'-TCGTGATGACGTGCGTTCGTCG -3'
	gE reverse	5'-CGCGGAACCAGTCGTCGAAGC -3'
	gE probe	5'-CTACGAGGGGCCGTACGCGAGCCTGGA -3'
(b)	gB forward	5'-ACAAGTTCAAGGCCACATCTAC -3'
	gB reverse	5'-GTCYGTGAAGCGGTTTCGTGAT -3'
	gB probe	5'-ACGTCATCGTCACGACC -3'
	gE forward	5'-CTTCCACTCGCAGCTCTTCTC -3'
	gE reverse	5'-GTRAAGTTCTCGCGCGGAGT -3'
	gE probe	5'-TTCGACCTGATGCCGC-3'

Analisi statistica

Al fine di valutare la concordanza tra i risultati delle due PCR, non esistendo un gold standard a cui fare riferimento, è stato calcolato il coefficiente kappa di Cohen (k). L'interpretazione del coefficiente è quella descritta da Landis et al. (1977) secondo i seguenti range: $k < 0.00$ concordanza "scarsa", $0 < k < 0.02$ "lieve", $0.21 < k < 0.40$ "discreta", $0.41 < k < 0.60$ "moderata," $0.61 < k < 0.80$ "sostanziale", e $0.81 < k < 1.00$ "eccellente".

3.1.3. Risultati e Discussione

I due protocolli di real time PCR hanno mostrato analogha sensibilità analitica per gB ($k=1$) quando sono state analizzate le diluizioni dei due stock virali (Tab. 1). Per entrambe le PCR per gB, la soglia di rilevamento è stata la diluizione 10^{-7} , che coincide col titolo ottenuto in tessutocoltura e calcolato secondo la formula di Reed-Muench. Tale dato discorda con quanto riportato da Ma et al., 2008, che descrive una sensibilità maggiore di due diluizioni per la real time PCR. Considerando le singole reazioni per gE, la real time PCR (b) è risultata più sensibile rispetto alla (a), in quanto la prima ha dato esito positivo nel 60% dei campioni (fino alla diluizione 10^{-6}), al confronto di un 40% (fino a 10^{-5}) della seconda. La concordanza calcolata per le due reazioni è comunque risultata "sostanziale" ($k=0.62$). Inoltre entrambe le reazioni per gE si sono dimostrate meno sensibili rispetto a quelle per il rilevamento di gB (Tab.1). Questo dato potrebbe essere associato anche al fatto che il gene gE è meno conservato rispetto il gene gB.

Tab. 1: Risultati (espressi come Ct) delle real time PCR

Stock virale e diluizione	gB		gE	
	(a)	(b)	(a)	(b)
252504 10 ⁻⁴	26,3	28,1	29,3	29,7
252504 10 ⁻⁵	29,7	31,8	33,4	33,9
252504 10 ⁻⁶	33,7	35,2	-	37,2
252504 10 ⁻⁷	36,4	37,1	-	-
252504 10 ⁻⁸	-	-	-	-

54/84 10 ⁻⁴	25,4	27,5	29,7	29,1
54/84 10 ⁻⁵	28,2	30,3	32,3	33,3
54/84 10 ⁻⁶	31,1	34,8	-	37,5
54/84 10 ⁻⁷	37,4	37,5	-	-
54/84 10 ⁻⁸	-	-	-	-

Le real time PCR eseguite sui campioni ottenuti dall'infezione sperimentale (Tab. 2) hanno fornito risultati analoghi tra loro sia per gB che per gE (K=1). In particolare, tutte le tonsille sono risultate positive sia per gB che per gE. Al contrario, gli encefali sono risultati positivi per gB, ma negativi per gE. Questo potrebbe essere dovuto ad una minore sensibilità delle due PCR per gE e/o ad una ridotta quantità di genoma di SHV-1 rilevabile a livello di SNC.

Tab. 2: Risultati (espressi come Ct) delle real time PCR

N. suino	gB		gE		
	(a)	(b)	(a)	(b)	
		Tonsille		Tonsille	
1264 (5g p.i.)	32,8	27,8	30	29,8	
1295 (5g p.i.)	28,2	25,1	30	27,7	
1265 (8g p.i.)	31,6	30,2	34,5	32,1	
1298 (11g p.i.)	33,8	33,9	34,6	36,5	
1230 (11g p.i.)	28,9	28,4	30,4	30,4	
1260 (19g p.i.)	29,3	28,8	30,1	31,2	
1227 (19g p.i.)	29,8	28,9	29,1	30,5	
1718 (5g p.i.)	26,2	24,4	27,7	25,9	
122 (5g p.i.)	23	21,9	26	24,1	
		SNC		SNC	
1264 (5g p.i.)	33,6	34,8	-	-	
1295 (5g p.i.)	35,1	37,8	-	-	
1265 (8g p.i.)	35,1	35,7	-	-	
1228 (8g p.i.)	36,9	37,6	-	-	

Infine per quanto riguarda i materiali patologici i risultati ottenuti sono stati differenti: i due encefali di cane sono risultati positivi per gB e gE sia con il protocollo (a) che con il (b) mentre l'encefalo di bovino e il polmone di suino sono risultati positivi per gE con entrambe le PCR, ma positivi per gB solo con il protocollo (a) (Tab. 3).

Tab. 3: Risultati (espressi come Ct) delle real time PCR

Specie/organo	gB		gE	
	(a)	(b)	(a)	(b)
Cane SNC	26,2	28,4	29,7	27,6
Cane SNC	30,5	31,9	33,8	33,1
Bovino SNC	29,6	-	34,4	31,3
Suino polmone	16,1	-	19,3	18,9

Affinché queste metodiche molecolari trovino una più ampia applicazione è necessario che la sensibilità analitica sia superiore a quella ottenuta mediante isolamento in tessutocoltura. In particolare deve essere meglio verificata l'efficienza delle real time PCR su campioni di tessuto nervoso, dove la quantità di genoma virale è probabilmente minore e/o è minore l'efficienza dell'estrazione dell'acido nucleico. Dai risultati ottenuti appare chiaro che entrambi i protocolli di real time PCR, ad oggi ampiamente utilizzati in molti laboratori diagnostici, debbano a nostro avviso essere perfezionati.

3.2. Indagini sierologiche e virologiche in un allevamento indenne da Malattia di Aujeszky con sporadiche positività per la glicoproteina E

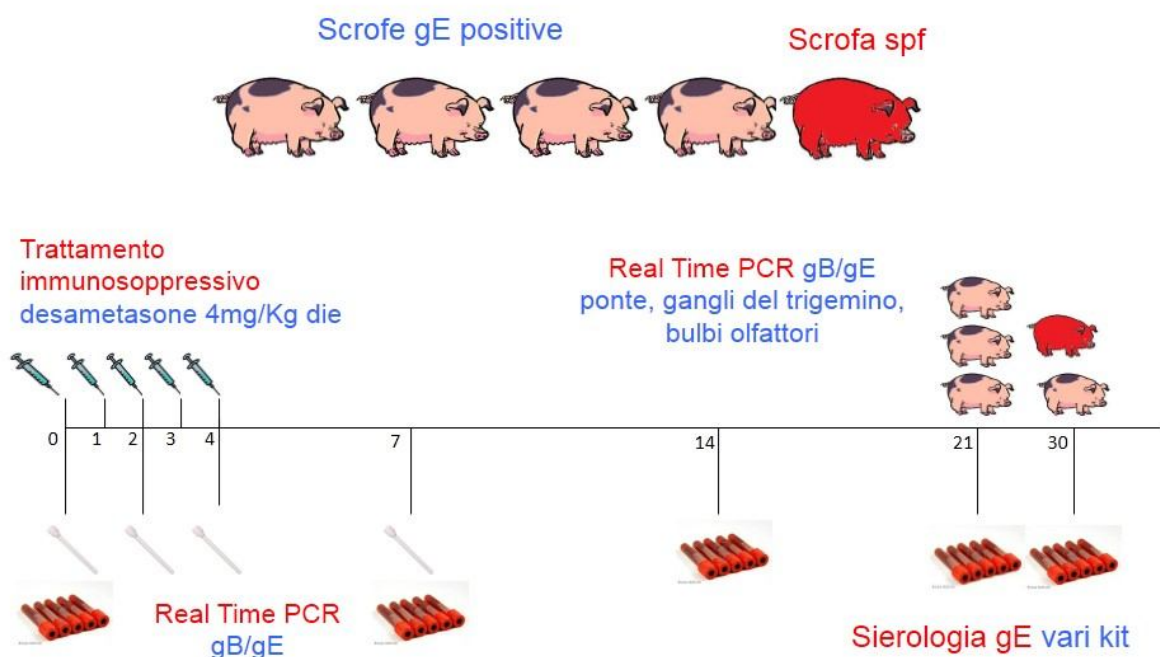
3.2.1. Introduzione

La malattia di Aujeszky, il cui agente eziologico è il Swine herpesvirus-1 (SHV-1), è una delle principali malattie dell'allevamento suinicolo per la quale è prevista la vaccinazione obbligatoria di tutti i suini presenti in azienda con vaccini deleti della glicoproteina E (gE). L'importanza della malattia è legata alla sua elevata contagiosità: l'introduzione di SHV-1 all'interno di un allevamento indenne e vaccinato determina una rapida diffusione dell'infezione, in assenza di una sintomatologia clinica manifesta, ed una sieroconversione per la gE della quasi totalità della popolazione suscettibile (Alborali L. et al 2007). Nel Gennaio del 2011 in un allevamento a ciclo chiuso (classificato dal 2004 come indenne da malattia di Aujeszky) è stata riscontrata nel corso dell'attività di monitoraggio dei Servizi Veterinari delle ASL di Cremona la sieropositività verso la glicoproteina gE di una singola scrofa. Ulteriori indagini sierologiche eseguite al fine di verificare la situazione reale in allevamento, hanno evidenziato un totale di 8 animali sieropositivi su un numero complessivo di 911 riproduttori, mentre i suini all'ingrasso (campione di 100 capi) sono risultati negativi. Con l'obiettivo di mantenere la qualifica di allevamento indenne l'allevatore, in accordo con i Servizi Veterinari e con il centro di referenza nazionale per la Malattia di Aujeszky, ha provveduto all'allontanamento delle scrofe gE positive. Quattro degli 8 riproduttori gE positivi sono stati trasferiti presso le stalle di isolamento dell'IZSLER al fine di condurre ulteriori indagini per chiarire la positività di un numero così esiguo di suini.

3.2.2. Materiali e Metodi

Quattro degli 8 soggetti gE positivi sono stati trasferiti presso le stalle di isolamento dell'IZSLER e sottoposti ad un trattamento immunosoppressivo (Schema.1) con desametasone 4mg/Kg/die per 5 giorni al fine di valutare la possibile latenza e l'eventuale riattivazione del virus herpesico (Yoon et al. 2005). Inoltre per verificare la trasmissione dell'infezione è stata inserita nel gruppo una scrofa controllo "specific pathogen free" (SPF). Durante il trattamento ogni 48 ore (T0 – T1 - T2 – T3) sono stati eseguiti tamponi nasali da sottoporre ad analisi mediante real time Pcr (Ma et al. 2008) e ogni settimana (T0 - T3 – T4 – T5 – T6) sono stati prelevati campioni di sangue da sottoporre a test ELISA (Lelli D. et al 2007) per valutare variazioni del titolo anticorpale. Trascorsi 30 giorni (T6) gli animali sono stati sacrificati e per ciascun soggetto sono stati prelevati i gangli del trigemino, i bulbi olfattori ed il ponte per la ricerca del genoma virale.

Schema.1: protocollo operativo



3.2.3. Risultati e Discussione

I tamponi nasali sono risultati negativi in real time PCR per le glicoproteine gB e gE. I campioni di siero hanno presentato un titolo anticorpale uguale a quello pre-trattamento farmacologico per i quattro animali già sierologicamente positivi, mentre la scrofa SPF non ha mostrato sieroconversione (Tab.4 e Tab.5).

I gangli del trigemino, i bulbi olfattori ed il ponte sottoposti a real time PCR sono risultati anch'essi negativi.

Tab.4 Risultati delle real time PCR e sierologia da T0 a T3

scrofa	T0 - giorno 0				T1 - giorno 2		T2 - giorno 4		T3 - giorno 7			
	real time PCR		sierologia		real time PCR		real time PCR		real time PCR		sierologia	
	gB	gE	gB	gE	gB	gE	gB	gE	gB	gE	gB	gE
1	-	-	1/64	1/64	-	-	-	-	-	-	1/64	1/64
2	-	-	2/256	>1/256	-	-	-	-	-	-	2/256	>1/256
3	-	-	1/16	1/65	-	-	-	-	-	-	1/16	1/65
4	-	-	1/64	>1/256	-	-	-	-	-	-	1/64	>1/256
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab.5 Risultati delle real time PCR e sierologia da T4 a T6

scrofa	T4 - giorno 14		T5 - giorno 21		T6 - giorno 30			
	sierologia		sierologia		real time PCR		sierologia	
	gB	gE	gB	gE	gB	gE	gB	gE
1	1/64	1/64	1/64	1/64	-	-	1/64	1/64
2	2/256	>1/256	2/256	>1/256	-	-	2/256	>1/256
3	1/16	1/65	1/16	1/65	-	-	1/16	1/65
4	1/64	>1/256	1/64	>1/256	-	-	1/64	>1/256
5	-	-	-	-	-	-	-	-

Tenuto conto che l'allevamento era indenne da diversi anni e considerando il carattere diffusivo della malattia risulta difficile spiegare la sieropositività di solo 8 scrofe, di età compresa fra i 2 e 3 anni, introdotte in tempi diversi in azienda e dunque non appartenenti ad uno stesso gruppo.

A nostro avviso due possono essere le possibilità in grado di spiegare questa situazione particolare. La prima una riattivazione del virus latente che ha interessato realmente un numero limitato di riproduttori, ma a nostro parere appare la causa meno plausibile. La seconda invece riguarda le problematiche connesse

alla sensibilità/specificità dei test sierologici e alla presenza dei cosiddetti falsi positivi. In letteratura sono descritti casi di falsi positivi gE anche in altri Paesi, tuttavia trattasi sempre di un numero molto limitato di soggetti, per questo definiti “single reactor”.

3.3. Indagini sierologiche e virologiche al macello: ricerca del virus latente della Malattia di Aujeszky nel Sistema Nervoso Centrale

3.3.1. Introduzione

Come tutti i virus appartenenti alla famiglia delle *Herpesviridae*, SHV-1 è in grado di infettare il tessuto nervoso dell'ospite naturale. La riattivazione del virus latente può avvenire in concomitanza ad eventi stressogeni naturali (Enquist et al. 2002) ed il suino sieronegativo torna una possibile fonte di contagio all'interno dell'allevamento (Rock et al. 1993). In questo studio è stata condotta un'indagine epidemiologica sulla sieroprevalenza di SHV-1 e sulla presenza di "virus latente" a livello di SNC in campioni di suini raccolti presso un'industria di macellazione.

3.3.2. Materiali e Metodi

Presso un macello localizzato nel Nord Italia sono stati raccolti campioni di siero e di tessuto nervoso (tronco encefalico) di 55 suini (peso medio 160/170 Kg) provenienti da 9 differenti allevamenti. I campioni sono stati raccolti dal 20 Maggio 2011 al 8 Giugno 2011.

Sierologia: i campioni di siero raccolti sono stati analizzati al fine di valutare la sieroprevalenza di SHV-1 (gB e gE) mediante l'utilizzo di un kit ELISA (Lelli D. et al. 2007).

PCR: il genoma virale è stato estratto dal tessuto nervoso (approssimativamente 100 mg) mediante l'utilizzo del kit QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen®) secondo le modalità descritte dal produttore. La presenza del genoma virale è stata valutata mediante l'utilizzo di due real time PCR aventi come target genico la glicoproteina gB e gE di SHV-1 (Yoon et al. 2005).

3.3.3. Risultati e Discussione

Dei 55 campioni di siero analizzati 45 (82%) sono risultati sierologicamente positivi sia per gB che per gE. I rimanenti 10 campione (18%) sono risultati negativi per entrambe le glicoproteine testate.

Le real time PCR hanno evidenziato 5 campioni (9%) di tessuto nervoso positivi per gB, ed uno di questi positivo anche per gE.

Tutti i risultati ottenuti sono riportati in Tab.6

I dati ottenuti da questa indagine dimostrano che la sieroprevalenza di SHV-1 nei suini “pesanti” in Italia è ancora molto elevata e che il Programma di Vaccinazione obbligatorio viene molto smesso disatteso. Inoltre il lavoro evidenzia come i ceppi di campo di SHV-1 siano in grado di determinare un’infezione di tipo latente in animali apparentemente sani da un punto di vista clinico.

I dati raccolti evidenziano che un controllo sierologico al macello rappresenta un punto critico per il successo del Piano di Eradicazione della malattia di Aujeszky. A dimostrazione di questa tesi si ricorda che in tempi successivi al presente lavoro sia la Regione Lombardia che la Regione Veneto sono intervenute in maniera autonoma “rafforzando” il Piano di Eradicazione con l’introduzione di nuove misure di controllo e prevenzione, fra le quali anche il monitoraggio al macello (Decreto n. 10784 del 17-11-2011 della Regione Lombardia e Delibera n. 2061 del 11-10-2012 della Regione Veneto).

Tab.6: Risultati real time PCR e sierologia

ALLEV.	DATA	SUINO	real time PCR		sierologia	
			gB	gE	gB	gE
A	20/05/2011	1	-	-	1/256	>1/256
		2	-	-	1/256	>1/256
		3	-	-	>1/256	1/64
		4	-	-	>1/256	>1/256
		5	-	-	1/64	1/64
B	20/05/2011	6	-	-	>1/256	>1/256
		7	-	-	>1/256	>1/256
		8	-	-	>1/256	>1/256
		9	-	-	>1/256	>1/256
		10	-	-	>1/256	>1/256
C	20/05/2011	11	-	-	-	-
		12	-	-	-	-
		13	-	-	-	-
		14	-	-	-	-
		15	-	-	-	-
D	25/05/2011	16	-	-	>1/256	>1/256
		17	-	-	1/256	>1/256
		18	-	-	>1/256	>1/256
		19	-	-	>1/256	>1/256
		20	-	-	>1/256	>1/256
E	25/05/2011	21	-	-	>1/256	>1/256
		22	-	-	1/256	>1/256
		23	-	-	>1/256	>1/256
		24	-	-	>1/256	>1/256
		25	-	-	1/64	1/64
F	25/05/2011	26	32,97	-	>1/256	>1/256
		27	-	-	>1/256	>1/256
		28	-	-	>1/256	>1/256
		29	-	-	>1/256	>1/256
		30	-	-	>1/256	>1/256
E	08/06/2011	31	-	-	1/256	>1/256
		32	-	-	>1/256	>1/256
		33	-	-	>1/256	>1/256
		34	-	-	1/256	>1/256
		35	-	-	1/256	>1/256
F	08/06/2011	36	-	-	>1/256	>1/256
		37	34,58	-	>1/256	1/64
		38	-	-	>1/256	>1/256
		39	34,84	-	>1/256	>1/256
		40	-	-	>1/256	>1/256
G	08/06/2011	41	-	-	>1/256	1/64
		42	-	-	>1/256	>1/256
		43	30,79	37,8	1/256	1/256
		44	-	-	>1/256	>1/256
		45	34,7	-	>1/256	>1/256
H	08/06/2011	46	-	-	1/256	>1/256
		47	-	-	>1/256	>1/256
		48	-	-	>1/256	>1/256
		49	-	-	1/64	>1/256
		50	-	-	1/64	>1/256
I	08/06/2011	51	-	-	-	-
		52	-	-	-	-
		53	-	-	-	-
		54	-	-	-	-
		55	-	-	-	-

3.4 Valutazione dell'impatto zootecnico e dell'incidenza economica della Malattia di Aujeszky in un allevamento di suini a ciclo chiuso

3.1 Introduzione

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di quantificare l'impatto zootecnico della malattia di Aujeszky in un allevamento di suini a ciclo chiuso. Per valutare l'incidenza della malattia sono stati presi in esame gli indici produttivi aziendali prima e dopo l'applicazione di un corretto programma vaccinale e gestionale che ha portato ad una riduzione della prevalenza della malattia stessa. Lo studio ha avuto inizio nel Gennaio del 2012 ed è terminato nel Settembre del 2013. Successivamente all'analisi zootecnica è stata fatta una valutazione di ordine economico.

3.2 Materiali e Metodi

Descrizione dell'allevamento

Allevamento: la prova è stata condotta in un allevamento italiano di suini a ciclo chiuso situato nella provincia di Cremona, positivo per Aujeszky. Si compone di un parco scrofe produttive di circa 600 unità. La rimonta del comparto riproduttivo avviene mediante l'acquisto di scrofette del peso di 8 Kg, Aujeszky negative.

Mediamente vengono svezzati circa 12.500 suinetti l'anno, e macellati circa 12.000 suini grassi 160/170 Kg.

Stato sanitario: nel Gennaio 2012 in riferimento alla malattia di Aujeszky la situazione si presentava nel seguente modo:

- 60 % delle scrofe presenti in allevamento sierologicamente positive (gE+)
- 50% dei suini all'ingrasso sierologicamente positivi (gE+)

Dati zootecnici: i principali dati zootecnici dell'allevamento nel Gennaio 2012 sono riportati in Tab.7

Tab.7 parametri zootecnici Gennaio 2012

	parametro zootecnico	Gennaio 2012
Reparto Riproduzione		
	Intervallo svezzamento – estro	10 d.
	Giorni non produttivi per scrofa	25 d.
	Scrofe riformate anno	22 %
	Nati totali per scrofa	11,2
	Nati vivi per scrofa	10,1
	Suinetti per scrofa svezzati anno	20,9
	Parti per scrofa anno	2,1
	Portata al parto	78 %
Reparto Svezzamento		
	Mortalità	5 %
	IMG incremento medio giornaliero	370 gr.
	ICA indice conversione	1,9
Reparto Ingrasso		
	Mortalità	5 %
	Giorni di permanenza	204
	IMG incremento medio giornaliero	675 gr.

Revisione e potenziamento del programma vaccinale

A partire da Gennaio 2012 nell'allevamento in questione si è deciso di rivedere il programma vaccinale per la malattia di Aujeszky adottato in allevamento, al fine di ridurre la circolazione di SHV-1. L'obiettivo finale è stato quello di limitare totalmente la circolazione virale e quindi arrivare alla qualifica di allevamento ufficialmente indenne. La revisione del piano di profilassi sanitaria ha riguardato i seguenti punti:

- Scelta di un vaccino disponibile sul mercato in grado di offrire un'immunità elevata e duratura nei suini vaccinati
- Predisposizione di un corretto programma vaccinale delle scrofette di rimonta al fine di garantire, a partire da Gennaio 2012, una rimonta gE-
- Predisposizione di un corretto programma vaccinale delle scrofe

- Predisposizione di un corretto programma vaccinale dei suini destinati all'ingrasso. In particolare:
 - Scelta corretta del timing per la prima vaccinazione in funzione del calo dell'immunità di origine materna
 - Applicazione rigorosa dello schema di vaccinazione previsto dal Decreto del Ministero della Salute del 1° Aprile 1997
 - Primo intervento fra 60-90 giorni di vita
 - Secondo intervento a distanza di 21-28 giorni dal primo
 - Terzo intervento fra il 6° e 7° mese di vita
- Stesura ed applicazioni di Manuali Operativi al fine di adottare procedure operative standard durante la vaccinazione
- Stesura ed applicazione di un Piano di Autocontrollo della vaccinazione (monitoraggio sierologico al fine di valutare la prevalenza in allevamento di SHV-1)

Valutazione economica

Per una valutazione economica dei parametri zootecnici sono stati utilizzati i dati forniti dalle seguenti istituzioni:

- C.R.P.A – Centro Ricerche e Produzioni Animali s.p.a.
- Camera di Commercio di Mantova

3..3 Risultati e Discussione

Al termine del periodo di monitoraggio della prova (Settembre 2013) ed in seguito all'applicazione del programma vaccinale sopra descritto si è osservato quanto segue:

Stato sanitario:

- 30 % delle scrofe presenti in allevamento sierologicamente positive (gE+)
- 10 % dei suini all'ingrasso sierologicamente positivi (gE+)

Rispetto la situazione iniziale si può osservare un netto calo della prevalenza dei suini infetti presenti in allevamento.

Dati zootecnici: rispetto i dati di Gennaio 2012 anche in questo caso si assiste ad un miglioramento di tutti i parametri produttivi dell'allevamento. In Tab.8 sono riportati i parametri di maggior interesse e le loro variazioni nel periodo compreso fra Gennaio 2012 e Settembre 2013

Tab.8 parametri zootecnici Gennaio 2012 - Settembre 2013

	parametro zootecnico	Gennaio 2012	Settembre 2013
Reparto Riproduzione			
	Intervallo svezzamento – estro	10 d.	10 d.
	Giorni non produttivi per scrofa	25 d.	24 d.
	Scrofe riformate anno	22 %	32 %
	Nati totali per scrofa	11,2	11,8
	Nati vivi per scrofa	10,1	11
	Suinetti per scrofa svezzati anno	20,9	21,3
	Parti per scrofa anno	2,1	2,2
	Portata al parto	78 %	79 %
Reparto Svezzamento			
	Mortalità	5 %	4,5 %
	IMG incremento medio giornaliero	370 gr.	380 gr.
	ICA indice conversione	1,9	1,85
Reparto Ingrassio			
	Mortalità	5 %	4,5 %
	Giorni di permanenza	204	198
	IMG incremento medio giornaliero	675 gr.	680 gr.

Valutazione economica

Con riferimento ai dati riportati in Tab.8, di seguito verrà elaborata un'analisi di tipo economico il cui obiettivo è quello di quantificare il “danno” economico che la malattia di Aujeszky ha provocato nell'allevamento di suini oggetto dello studio. Verrà equiparato il costo della malattia al maggior profitto ricavato dall'allevatore in seguito al miglioramento delle performance riproduttive ottenute dall'applicazione di un corretto programma vaccinale. Tutte le rielaborazioni di seguito riportate si riferiscono all'anno solare.

Reparto riproduzione

Per il reparto riproduzione sono stati presi in esame i seguenti parametri:

- Portata parto: ogni punto % di portata al parto è stato valutato pari a 5 Euro per ogni scrofa presente in allevamento (fonte C.R.P.A.)
- Numero di suinetti svezzati scrofa: ad ogni suinetto svezzato è stato attribuito un valore di 40 Euro (fonte Camera di Commercio di Mantova)
- Giorni improduttivi scrofa: ogni giorno improduttivo è stato valutato pari a 2.5 euro scrofa (fonte C.R.P.A.)

In Tab.9 segue la rielaborazione dei dati secondo i criteri sopra descritti

Tab.9 Valutazione economica Reparto Riproduzione

REPARTO RIPRODUZIONE	GENNAIO 2012	SETTEMBRE 2013	GUADAGNO PER CAPO	PROIEZIONE AZIENDA
NUMERO SCROFE		600	EURO	EURO
% PORTATA AL PARTO	78	79	5,0	3.000
NUMERO SVEZZATI/SCROFA	20,9	21,3	16	9.600
GIORNI IMPRODUTTIVI	25	24	2,5	1.500
TOTALE			23,5	14.100

Reparto svezzamento

Per il reparto svezzamento sono stati presi in esame i seguenti parametri:

- Mortalità: ad ogni suinetto svezzato è stato attribuito un valore di 40 Euro (fonte Camera di Commercio di Mantova)
- IMG incremento medio giornaliero: è stata considerata una durata media della fase di svezzamento di 55 giorni ed un prezzo di vendita del suino di 30 Kg pari a 70 Euro (2,4 Euro/Kg) (fonte Camera di Commercio di Mantova e C.R.P.A.)
- ICA indice di conversione: è stato considerato un incremento medio del suino nella fase di svezzamento di 25 Kg ed un costo del mangime pari a 0.5 Euro/Kg

In Tab.10 segue la rielaborazione dei dati secondo i criteri sopra descritti

Tab.10 Valutazione economica Reparto Svezzamento

REPARTO SVEZZAMENTO	GENNAIO 2012	SETTEMBRE 2013	GUADAGNO PER CAPO	PROIEZIONE AZIENDA
PRESENZA SVEZZATI		12500	EURO	EURO
% MORTALITA'	5	4,5	0,2	2.500
INDICE DI CONVERSIONE	1,9	1,85	0,625	7.812
Kg INCREMENTO MEDIO GIORNALIERO	0,37	0,38	1,320	16.500
TOTALE			2,145	26.813

Reparto Ingrasso

Per il reparto ingrasso sono stati presi in esame i seguenti parametri:

- Mortalità: ad ogni suino di 30 Kg è stato attribuito un valore di 70 Euro (fonte Camera di Commercio di Mantova)
- IMG incremento medio giornaliero: è stata considerata una durata media della fase di ingrasso di 180 giorni ed un prezzo di vendita del suino di 165 Kg pari a 255 Euro (1.55 Euro/Kg) (fonte Camera di Commercio di Mantova e C.R.P.A.)

Giorni di permanenza: ogni giorno di permanenza è stato valutato pari 0,1 Euro capo.

In Tab.11 segue la rielaborazione dei dati secondo i criteri sopra descritti

Tab.11 Valutazione economica Reparto Ingrasso

REPARTO INGRASSO	GENNAIO 2012	SETTEMBRE 2013	GUADAGNO PER CAPO	PROIEZIONE AZIENDA
PRESENZA GRASSI		12000	EURO	EURO
MORTALITA'	5	4,5	0,35	4.200
GIORNI PERMANENZA	204	198	0,6	7.200
KG INCREMENTO MEDIO GIORNALIERO	0,675	0,68	1,395	16.740
TOTALE			2,35	28.140

L'attuazione di un corretto programma vaccinale ha consentito di ridurre la prevalenza di SHV-1 in allevamento con un conseguente miglioramento di tutti gli indici produttivi dell'azienda stessa.

Dalla valorizzazione economica di tali parametri è emerso quanto segue:

- Reparto riproduzione: un guadagno annuo di 23,50 Euro per ogni scrofa

presente in allevamento

- Reparto svezzamento: un guadagno annuo di 2,145 Euro per ogni suino presente in svezzamento
- Reparto ingrasso: un guadagno annuo di 2,350 Euro per ogni suino presente nell'ingrasso.
- Considerando l'intero allevamento si può stimare un guadagno pari a circa 55.000 Euro

In Tab.12 è riportata la situazione riassuntiva

Tab.12 Valutazione economica Allevamento

REPARTO RIPRODUZIONE	CAPI PRESENTI	GUADAGNO PER CAPO	GUADAGNO AZIENDA
REPARTO RIPRODUZIONE	600	23,500	14.100
REPARTO SVEZZAMENTO	12500	2,145	26.813
REPARTO INGRASSO	12000	2,350	28.200
TOTALE			55.013

Equiparando il “costo” della malattia di Aujeszky al maggior profitto ottenuto dall'azienda, calcolato in base alla valorizzazione dei parametri zootecnici, si può affermare che l'azienda di suini oggetto dello studio ha beneficiato in modo concreto della riduzione della prevalenza di SHV-1 in allevamento. Tutti i parametri dell'azienda sono migliorati nell'arco di tempo oggetto dello studio, a dimostrazione che la Pseudorabbia è in grado di influenzare trasversalmente i risultati di tutti i settori dell'allevamento, dal reparto riproduzione sino alla fase di ingrasso.

4 Conclusioni

La malattia di Aujeszky si presenta ad oggi come una delle principali patologie della moderna suinicoltura. L'allevamento del suino a carattere intensivo ha infatti creato le condizioni favorevoli alla diffusione della malattia, che ha così preso il sopravvento rispetto alle problematiche di natura infettiva.

Dall'importanza di questa malattia ne scaturisce l'esigenza da parte del medico veterinario di avere a disposizione degli strumenti diagnostici rapidi ed efficienti. Da qui prendono spunto i primi due lavori di questa Tesi, in cui sono state esaminate delle metodiche diagnostiche di laboratorio e sono state evidenziate le loro peculiarità e i loro limiti.

Successivamente è stato dimostrato, mediante un'attività di monitoraggio al macello, come la prevalenza di SHV-1 negli allevamenti italiani sia ancora molto elevata. È chiaro che l'Italia, a differenza di altri Paesi a suinicoltura avanzata, non è stata in grado di affrontare il problema in modo risolutivo. La mancanza di risultati concreti nel controllo della Pseudorabbia ha recentemente portato alcune Regioni, quali la Lombardia ed il Veneto, a rafforzare il programma nazionale di controllo. Tutto questo dimostra che la malattia di Aujeszky ricopre ancora oggi un ruolo di prim'ordine per la suinicoltura italiana, che lo stato di allerta da parte del Sistema Sanitario Nazionale è particolarmente elevato e che il monitoraggio al macello, come da noi proposto, risulta essere un'attività fondamentale per l'eradicazione della Pseudorabbia.

Infine l'attenzione è stata rivolta all'aspetto prettamente zootecnico. Prendendo in considerazione quelli che sono i parametri più importanti dell'allevamento, è stata fatta una valutazione del costo che la malattia di Aujeszky ha in un'azienda di suini. Dalle nostre analisi appare chiaro che la Pseudorabbia rappresenta un costo non indifferente per l'allevamento, e che di conseguenza l'eradicazione della malattia dovrebbe avere come

primo sostenitore l'allevatore stesso.

In conclusione possiamo dire che la malattia di Aujeszky, descritta per la prima volta nel 1813, rimane ancora oggi in Italia una delle principali patologie di natura infettiva della moderna suinicoltura. I lavori di questa Tesi trovano spunto da questa considerazione e sono stati condotti con l'obiettivo di comprendere meglio alcuni aspetti che caratterizzano la Pseudorabbia.

Bibliografia

- Alborali L. et al, 2007. Atti SIPAS XXXIII Meeting Annuale , 283-287.
- Baskerville, A., McFerran, J., Dow, C., 1973. Aujeszky's disease in pigs. Vet.Bull 43, 456-480.
- Beran, G., 1991. Transmission of Aujeszky's disease virus. , 93-111.
- Christensen, L.S., Mousing, J., Mortensen, S., Soerensen, K., Strandbygaard, S., Henriksen, C., Andersen, J., 1990. Evidence of long distance airborne transmission of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Vet. Rec. 127, 471-474.
- Enquist, L., Tomishima, M., Gross, S., Smith, G., 2002. Directional spread of an α -herpesvirus in the nervous system. Vet. Microbiol. 86, 5-16.
- Farina, R., Scatozza, F., 1998. Trattato di malattie infettive degli animali , 520-528.
- Kluge, J., Beran, G., Hill, H., Platt, K., 1999. Pseudorabies (Aujeszky's disease). Diseases of swine 8, 233-246.
- Kritas, S.K., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., Kyriakis, S.C., 1997. Effect of the concentration of maternal antibodies on the neural invasion of Aujeszky's disease virus in neonatal pigs. Vet. Microbiol. 55, 29-36.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics , 159-174.
- Lelli D. et al, 2007. Atti SIPAS XXXIII Meeting Annuale , 359-364.
- Ma, W., Lager, K.M., Richt, J.A., Stoffregen, W.C., Zhou, F., Yoon, K., 2008. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20, 440-447.
- Maes, R.K., Sussman, M.D., Vilnis, A., Thacker, B.J., 1997. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Vet.

Microbiol. 55, 13-27.

- Mare, C., Kluge, J., Beran, G., 1976. Reproductive failure in swine infected with pseudorabies (Aujeszky's) virus. .
- Mettenleiter, T.C., 2000. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-state of the art, June 1999. Vet. Res. 31, 99-115.
- Mettenleiter, T.C., 1991. Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 14, 151-163.
- Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1995. Cell-free and cell-associated viremia in pigs after oronasal infection with Aujeszky's disease virus. Vet. Microbiol. 43, 307-314.
- Nauwynck, H., 1997. Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. Vet. Microbiol. 55, 3-11.
- Pensaert, M., Kluge, J., 1989. Pseudorabies virus (Aujeszky's disease). Virus infections of porcines , 39-64.
- Rock, D., 1993. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. 4, 157-165.
- Straw, B.E., Shin, S.J., Yeager, A.E., 1990. Effect of pneumonia on growth rate and feed efficiency of minimal disease pigs exposed to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Prev. Vet. Med. 9, 287-294.
- Straw, B.E., Tuovinen, V.K., Bigras-Poulin, M., 1989. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 195, 1702-1706.
- Toma, B., Haddad, N., Vannier, P., 2004. Aujeszky's disease. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals , 295-307.
- Van Rooij, E., Moonen-Leusen, H., De Visser, Y., Middel, W., Boersma, W., Bianchi, A., 2006. A DNA vaccine coding for gB and gD of pseudorabies virus (suid herpes type 1) primes the immune system in the presence of maternal immunity more

efficiently than conventional vaccines. *Vaccine* 24, 1264-1273.

- Wittmann, G., Rziha, H., 1989. Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs*. Springer, pp. 230-325.
- Yoon, H.A., Eo, S.K., Aleyas, A.G., Park, S.O., Lee, J.H., Chae, J.S., Cho, J.G., Song, H.J., 2005. Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and real-time PCR. *Journal of Microbiology – Seoul*-43, 430