

UTILIZZO DEI LAVAGGI BRONCO-ALVEOLARI PER LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA RESPIRATORIA DEL SUINO E LA SCELTA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA

USE OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FOR THE DIAGNOSIS OF SWINE RESPIRATORY DISEASE AND ANTIBIOTIC CHOICE

GIACOMINI E.¹, LAZZARO M.¹, TONNI M.², LEOTTI G.³

¹Libero professionista – Brescia;²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia;

³Boehringer Ingelheim Italia AH - Milano

Parole chiave: SRD, lavaggi broncoalveolari, antibiotici, suino

Key words: SRD, bronchoalveolar lavage, antibiotics, swine

Riassunto: Nell'ottica di una prudente utilizzazione degli antibiotici in corso di forme respiratorie, le tecniche diagnostiche che consentono di giungere, anche in animali vivi, all'isolamento dei batteri ed alla loro identificazione, assumono un ruolo importante nell'indirizzare la scelta del farmaco più appropriato per la terapia. Questo lavoro ha lo scopo di valutare l'efficacia del lavaggio broncoalveolare (BAL) nella diagnosi della malattia respiratoria del suino (SRD) e nel correlare i risultati ottenuti mediante questa tecnica, con la efficacia terapeutica della gamitromicina nei confronti di questa malattia. Sono stati eseguiti 400 BAL in dieci allevamenti, con un coinvolgimento complessivo di 200 suini. La terapia con gamitromicina è stata applicata alla metà dei suini coinvolti, mentre i suini non trattati hanno costituito il gruppo controllo. In 9 dei 10 allevamenti coinvolti, la tecnica BAL ha consentito di isolare almeno una specie batterica e il 17,25% dei fluidi ottenuti (BALF) sono risultati batteriologicamente positivi. I batteri maggiormente isolati da BALF sono stati: *Pasteurella multocida* e *Streptococcus suis*. I BALF hanno inoltre permesso di evidenziare in alcuni allevamenti, mediante tecniche biomolecolari, PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Dopo 24 ore dall'inizio della terapia, nel 70% dei suini trattati è stato registrato un miglioramento dello score clinico, con una differenza altamente significativa verso i controlli; inoltre in 8 dei 10 allevamenti coinvolti la percentuale dei suini nei quali si è registrato un miglioramento dello score clinico è stato superiore nei trattati verso i controlli ed in 5 di questi la differenza è risultata altamente significativa ($p < 0,01$).

Abstract: Diagnostic techniques play an important role in prudent use of antibiotics, helping to isolate and identify bacteria, also in live animals, and to guide the choice of the most appropriate drug for therapy. This study aimed the evaluation of the efficacy of bronchoalveolar lavage (BAL) in the diagnosis of swine respiratory disease (SRD) and its correlation with the therapeutic efficacy of gamithromycin. 400 BAL were performed in ten farms, in 200 pigs. The therapy with gamithromycin was applied to the half part of the pigs, the untreated pigs were the control group. In 9 farms the BAL technique allowed to isolate at least one bacteria and the 17,25% of the BAL fluids were bacteriologically positive. The most isolated bacteria were *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis*. A significant improvement of the clinical score was recorded in 70% of the treated pigs 24 hours after the beginning of the therapy. In 8 of 10 farms the percentage of pigs with an improvement of the clinical score was higher in the treated group and in 5 of these the difference was highly significant ($p < 0,01$).

INTRODUZIONE

Le recenti norme emanate dalle Autorità sanitarie sul corretto uso degli antibiotici in zootecnia (1) impongono un adeguamento delle tecniche diagnostiche atte a indirizzare con maggiore accuratezza le scelte terapeutiche. Le terapie adottate dovranno sempre più essere supportate dalle indicazioni fornite da specifici e aggiornati test di sensibilità e permettere, in condizioni di campo spesso complesse, la possibilità di adottare protocolli terapeutici completi e attuabili.

La tecnica per la diagnosi della *Swine Respiratory Disease* (SRD) utilizzata in questo lavoro, l'esame del lavaggio bronco-alveolare (BAL), è in grado di soddisfare le richieste delle Autorità sanitarie: consente l'isolamento di batteri in animali vivi e quindi la possibilità di aumentare il numero dei test di sensibilità effettuati, migliorando in questo modo le indicazioni fornite dal laboratorio diagnostico al veterinario aziendale nella scelta delle molecole più efficaci per la terapia (2).

La necessità di ridurre l'utilizzazione degli antibiotici in zootecnia porterà probabilmente a diminuire il numero e la durata dei trattamenti di massa per privilegiare terapie mirate (7). In questo lavoro si è sperimentata l'efficacia in campo verso SRD di un farmaco iniettabile che consente di facilitare la effettuazione di protocolli terapeutici completi verso questa malattia.

MATERIALI E METODI

Allevamenti e animali

Sono stati selezionati 10 allevamenti con episodi in corso di SRD, ma con suini non ancora trattati, almeno negli ultimi quindici giorni, con antibiotici, ne per via orale ne per via iniettiva. Tali allevamenti sono dislocati nella Regione Lombardia: sono esclusivamente allevamenti di svezzamento (siti 2), ingrasso (siti 3) o svezzamento-ingrasso (*weaning to finish*) con flussi gestiti in tutto-pieno/tutto-vuoto e con una capienza variabile da 2000 a 5000 capi presenti. Per ciascun allevamento sono stati arruolati 20 animali con un peso vivo compreso tra i 12 e 50 kg, tutti con sintomatologia clinica riconducibile a SRD (totale suini arruolati: 200). Gli animali sono stati successivamente assegnati in maniera casuale a due gruppi (A: trattati; B: non trattati – controllo).

Fluidi di lavaggio bronco-alveolare (BALF)

Ogni suino, preventivamente identificato singolarmente, è stato contenuto mediante l'utilizzo di torcinaso e morso apribocca per garantire l'apertura delle fauci. Una sonda monouso in plastica flessibile di 60 cm (PORTEX® Catheter, Smiths medical ASD, Inc.) è stata fatta scendere seguendo il profilo del palato duro e del palato molle, successivamente è stata fatta passare a livello del laringe nel momento di apertura dell'epiglottide per arrivare in trachea e fermarsi appena oltre la biforcazione bronchiale. La sonda è stata poi collegata ad una siringa sterile in plastica a cui è stato tolto l'ago ed è stato infuso un quantitativo pari a 10 ml di soluzione fisiologica all'interno dell'albero respiratorio. Dopo qualche secondo, il fluido del lavaggio (circa 3 ml) è stato delicatamente aspirato e inserito in una provetta sterile. I campioni così ottenuti sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione (4°C) e trasportati in laboratorio, entro poche ore, per essere immediatamente sottoposti all'analisi batteriologica ed eventualmente biomolecolare per i virus e Micoplasmia *spp.*

Score clinico

La gravità clinica è stata valutata secondo uno schema di classificazione precedentemente validato (3) e riportato in tabella 1. A ciascun soggetto è stato attribuito uno score (variabile da 0 a 3) in funzione delle condizioni del sensorio, dei sintomi respiratori, della tosse e della temperatura rettale.

Tabella 1. Parametri clinici utilizzati per classificare la gravità delle forse respiratorie (da: Roberts et al. 2011)

Table 1. Clinical parameter scoring system used to characterize respiratory disease in pigs (from: Roberts et al. 2011)

Score	Condizioni del sensorio	Sintomi respiratori	Tosse	Temperatura corporea
0 normale	Vigile, attivo, appetito normale, ben idratato, pelo normale	Frequenza e ritmo respiratorio nella norma, nessuna secrezione nasale anomala	Assente	Normale (<40°C)
1 lieve	Movimenti rallentati, pelo leggermente ruvido, può sembrare letargico ma dopo stimolazione reagisce normalmente	Frequenza respiratoria leggermente aumentata; leggero aumento della rumorosità della respirazione	Assente	Febbrile (≥40°C)
2 moderato	Non attivo, prevalentemente in decubito ma in grado di stare in piedi, magro, può essere disidratato	Aumento della frequenza respiratoria, alcune anomalie respiratorie	Occasionale	Febbrile (≥40°C)
3 grave	In decubito e riluttante ad alzarsi, magro, disidratato	Aumento della frequenza respiratoria con sforzi anormali - respirazione a bocca aperta, grugniti, postura a “cane seduto”	Ripetuta e marcata	Febbrile (≥40°C)

Diagnosi di laboratorio

Presso la sezione di Brescia dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia-Romagna (IZSLER) i BALF sono stati utilizzati per l’isolamento dei patogeni batterici e per la messa in evidenza di altri patogeni anche mediante tecniche biomolecolari. Sui batteri isolati si è proceduto alla valutazione della sensibilità agli antibiotici.

Protocollo sperimentale

In ognuno dei 10 allevamenti presi in esame sono stati individuati due gruppi (A e B) clinicamente omogenei di animali, costituito ognuno da 10 soggetti, individuati singolarmente (totale animali arruolati per ogni allevamento: 20).

Al giorno “0” della sperimentazione (T0) gli animali dei due gruppi sono stati valutati clinicamente secondo lo schema riportato in tabella 1; è stato inoltre effettuato il prelievo dei BALF.

Sempre a T0, gli animali del gruppo A sono stati trattati con gamitromicina (Zactran®, Boehringer Ingheleim Italia AH, Milano) iniettabile (dose: 1 ml ogni 25 Kg di PV per via IM, pari a 6 mg di p.a. per Kg di PV, con unico intervento). Gli animali del gruppo B non sono stati sottoposti a terapia (gruppo di controllo).

Il giorno successivo (giorno 1 della sperimentazione, T1), è stato ripetuto l’esame clinico, con relativa attribuzione del nuovo score clinico ed il prelievo dei BALF, di tutti i soggetti.

Analisi statistica

Preliminarmente, sono state valutate eventuali differenze statisticamente significative in termini di gravità della sintomatologia (score) al giorno T0 della sperimentazione. Successivamente è stata valutata la variazione dello score clinico dei due gruppi di prova, sia considerando il complesso dei soggetti, sia esaminando singolarmente le aziende.

A tale scopo, le condizioni cliniche sono state considerate come:

- “migliorate” se gli animali, a 24 ore dall’inizio della sperimentazione (T1), presentavano un valore di score clinico inferiore rispetto a quello osservato a T0;
- “stabili o peggiorate” se gli animali, a 24 ore dall’inizio della sperimentazione (T1), presentavano un valore di score clinico uguale o superiore rispetto a quello osservato a T0.

I dati quantitativi sono stati analizzati utilizzando il test di Mann-Whitney, mentre per i dati qualitativi è stato utilizzato il test chi-quadrato. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS ver. 23.

RISULTATI

In 9 dei 10 allevamenti coinvolti, l’esame batteriologico dei BALF ha consentito l’isolamento di almeno una specie batterica e il 17,25% dei 400 fluidi estratti è risultato batteriologicamente positivo. La suddivisione per specie dei 76 batteri isolati dai BALF è stata, in ordine decrescente di frequenza di isolamento, la seguente: *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*. L’esame dei BALF mediante tecniche biomolecolari ha inoltre permesso di evidenziare, in alcuni allevamenti, PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

L’inoculazione del farmaco utilizzato non ha indotto nessuna reazione locale o generale degna di nota.

La condizione clinica dei soggetti dei due gruppi ad inizio sperimentazione (T0) è riportata in figura 1. La media dello score clinico è risultata di 2,01 e 2,02 rispettivamente nei soggetti del gruppo A e del gruppo B. Nessuna differenza statisticamente significativa ($p > 0,05$) è stata osservata per quanto riguarda sia la proporzione di soggetti entro le tre classi di gravità, sia per quanto riguarda il valore medio dello score clinico.

A 24 ore dall’inizio della sperimentazione (T1), tra i soggetti dei due gruppi è stata osservata una differenza altamente significativa ($p < 0,01$) della proporzione di soggetti che presentavano un miglioramento delle condizioni cliniche: il 70% dei soggetti trattati (gruppo A) presentavano a T1 una riduzione dello score clinico; nel gruppo B il miglioramento era evidente solo nel 31% degli animali (figura 2).

La figura 3 riporta la variazione della condizione clinica degli animali dei due gruppi osservata a T1 per ciascuna delle 10 aziende coinvolte nella sperimentazione. Tranne che nelle aziende 1 e 2, nelle quali non sono state osservate differenze tra i due gruppi di animali, negli altri 8 allevamenti la percentuale di animali in cui le condizioni cliniche sono migliorate è costantemente più elevata nel gruppo A (trattato). In 5 delle 10 aziende coinvolte (azienda 4, 6, 7, 8, 9) tale differenza è risultata altamente significativa ($p < 0,01$).

Figura 1. Inizio sperimentazione (T0). Percentuale di soggetti nelle tre classi di score clinico (tutti gli allevamenti).

Figure 1. Beginning of experimentation (T0). Percentage of subjects in the three classes of clinical score (all farms).

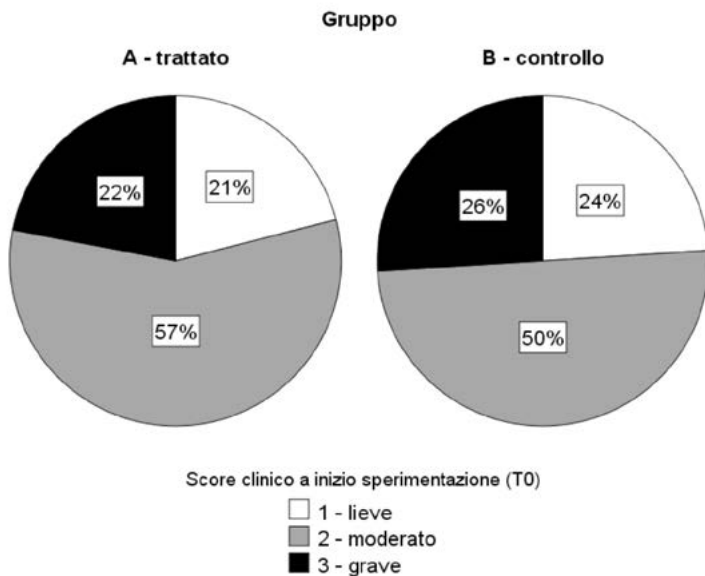


Figura 2. Fine sperimentazione (T1). Variazione delle condizioni cliniche degli animali dei due gruppi (tutti gli allevamenti).

Figure 2. End of experimentation (T1). Variation of the clinical conditions of the animals in the two groups (all farms).

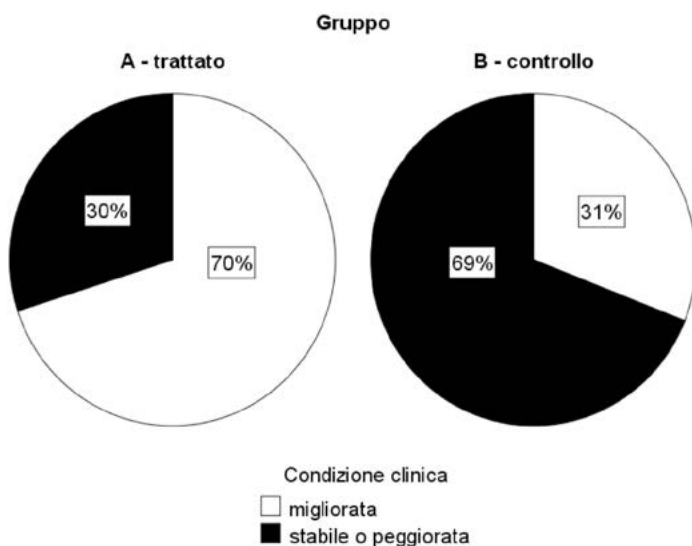
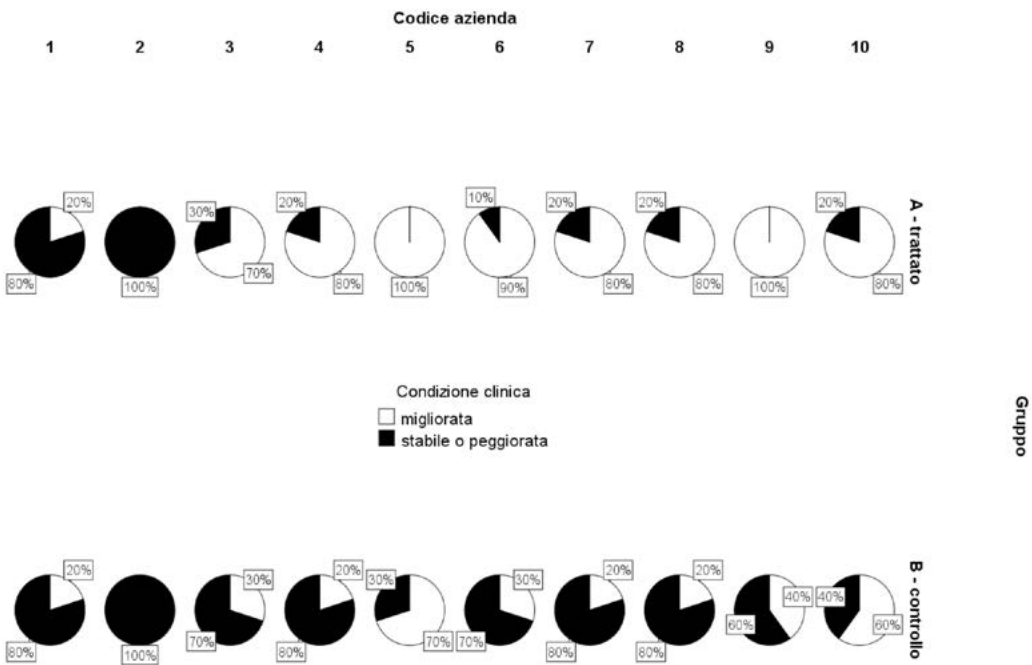


Figura 3. Fine sperimentazione (T1). Variazione delle condizioni cliniche degli animali dei due gruppi per ciascuna delle 10 aziende.

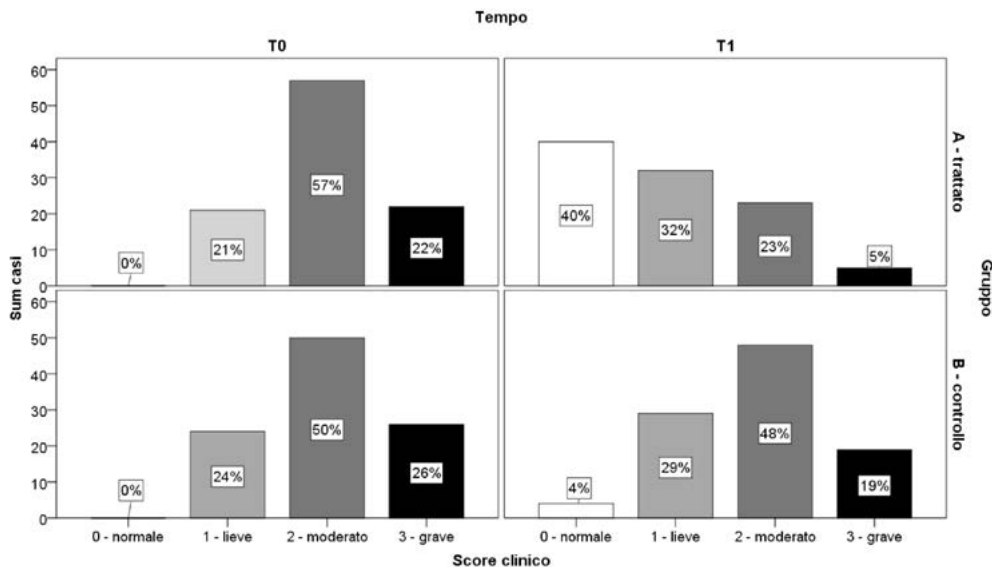
Figure 3. End of experimentation (T1). Variation of the clinical conditions of the animals in the two groups for each of the 10 farms.



La figura 4 riporta la distribuzione dei valori di score clinico nei due gruppi di animali (A e B) all'inizio della sperimentazione (T0) e 24 ore più tardi (T1). Solo il 28% dei suini trattati presentano in T1 sintomi clinici moderati o gravi (score 2 e 3) contro il 67% dei controlli.

Figura 4. Distribuzione di frequenza delle condizioni cliniche degli animali dei due gruppi a T0 (sinistra) e a T1 (destra).

Figure 4. Frequency distribution of the clinical conditions of the animals of the two groups at T0 (left) and at T1 (right).



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I 76 isolamenti batterici eseguiti a partire dai 400 fluidi di lavaggio bronco-alveolare (BALF) inviati al laboratorio, dimostrano l'efficacia di questa tecnica di prelievo del materiale diagnostico per quanto riguarda le possibilità di individuare i batteri agenti eziologici di SRD. Il BALF si è dimostrato inoltre utilizzabile in numerose condizioni di campo. Come già riportato in letteratura (2), l'esame dei BALF mediante tecniche biomolecolari, ha inoltre consentito di individuare altri agenti eziologici importanti di SRD, come PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tuttavia, in nessuno dei 400 BALF esaminati è stato possibile isolare *Actinobacillus pleuropneumoniae*, nemmeno dai campioni provenienti da aziende con anamnesi storica positiva per questo agente eziologico (isolato anche recentemente in queste stesse aziende a partire da tamponi tracheo-bronchiali -risultati non riportati); questo dato conferma l'osservazione già riportata da altri Autori (2) della apparente difficoltà di isolamento di *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partire dai BALF.

Le due specie batteriche di più frequente isolamento dai BALF in questo lavoro, *Pasterurella multocida* e *Streptococcus suis*, sono le stesse che risultarono le più isolate in una ampia indagine batteriologica condotta su polmoni di suino con problematiche sanitarie in Italia (4). Relativamente a *Streptococcus suis*, la sua responsabilità nelle forme respiratorie del suino è notoriamente controversa e sembra comunque partecipare esclusivamente come germe di irruzione secondaria su altre infezioni batteriche più propriamente polmonari (5). Il farmaco utilizzato non ha tra le sue indicazioni tale batterio e la sua attività nei confronti di questo germe non è conosciuta.

Per quanto riguarda invece *Haemophilus parasuis*, da tempo identificato come un potenziale agente eziologico di SRD (6) e isolato da suini, in certe realtà, con una frequenza elevata (2), in questo lavoro è stato isolato unicamente in 5 BALF provenienti dallo stesso allevamento (dato non riportato). Tuttavia, è nota e condivisa dai responsabili dei laboratori diagnostici nazionali, la difficoltà di isolamento di questo microrganismo nella diagnostica routinaria.

La efficacia clinica del farmaco impiegato, che ha una attività esclusivamente antibatterica, utilizzato nel corso dei 10 focolai di SRD presi in esame, è evidenziata con chiarezza dai risultati riportati nel presente lavoro che confermano quelli precedentemente ottenuti nel nostro paese con lo stesso farmaco (7).

Tale efficacia clinica va valutata anche alla luce di alcune considerazioni: a) gli agenti eziologici di SRD possono essere anche virali e questo potrebbe giustificare il fallimento della terapia antibiotica osservata in due aziende; b) la valutazione dell'efficacia clinica è stata eseguita a sole 24 ore dalla terapia, ma l'efficacia terapeutica della stessa si prolunga, per questo antibiotico, per almeno 6 giorni e fino a 10 in relazione ai batteri presenti nel suino trattato; c) in 8 focolai di SRD sui 10 presi in esame è stato osservato un maggior numero di suini con miglioramento dello score clinico nel gruppo dei trattati; in 5 di queste 8 aziende è stata osservata una differenza altamente significativa; d) in uno dei due focolai di SRD dove lo score clinico medio ed il numero di suini con miglioramento dello stesso non è variato da T0 a T1 per nessuno dei 20 suini presi in esame, sono stati isolati, da solo due dei 40 BALF inviati al laboratorio diagnostico, *Streptococcus suis* e *Trueperella pyogenes* (microrganismo quest'ultimo non considerato comunemente come potenziale agente eziologico di SRD (6)-dati non riportati): in tale azienda è stata evidenziata, con i test biomolecolari, la presenza di PRRSV in tutti i pool di BALF e sieri prelevati dai suini presi in considerazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Ministero della Salute (2012). Manuale di biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia, http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1683_allegato.pdf.
2. Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritz K. (2008). Association between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia, *Vet. Record*, 162, 267-272.
3. Roberts E., Hammer J.M., Lechtenberg K., Roycroft, L., King S. (2011). Investigation of tiamulin hydrogen fumarate in-feed antibiotic for the control of porcine respiratory disease complex that includes *Mycoplasma hyopneumoniae*", *J. Swine Health Prod.*, 19, 218-225.
4. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009). Application of a protocol for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy. *Vet. Record*, 164, 519-23.
5. Sala V. (2013). Streptococcosi. In: a cura di P. Martelli "Le patologie del maiale", PVI editore, cap.37, 551-562.
6. Opriessnig T., Giménez-Lirola L.G., Halbur P.G. (2011). Polymicrobial respiratory diseases in pigs. *Animal Health Research review*, 12,133-148.
7. Scollo A., Mazzoni C., Gottardo F. (2017). An alternative approach to reduce systematic oral mass antimicrobial use in pigs for a prudent use of antibiotics. In *Proceedings of the 9th European Symposium Porcine Health Management*, 3-5 May 2017, Poster session HME-053, 310.