UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

EPIDEMIOLOGIA DEI CORONAVIRUS E RISCHIO DI SPILLOVER DI SARS-COV-2 IN POPOLAZIONI DI SUINI ALLEVATI

Relatore:
Prof. Michele Drigo

Correlatrice
Dott.ssa Stefania Leopardi

Laureando
Gianluca Ruaro

Matricola n. 1170675

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

RIASSUNTO

Nel contesto pandemico attuale, la ricerca si è concentrata sulla rilevazione di quali animali potessero essere un potenziale serbatoio per SARS-CoV-2. I suini rappresentano una specie animale largamente impiegata ai fini alimentari ed è già suscettibile a sei specie di coronavirus propri.

In questa tesi, che rientra in un più ampio progetto europeo, sono stati condotti uno studio trasversale e uno longitudinale su un totale di 18 allevamenti suinicoli del nord-est Italia al fine di determinare l'andamento epidemiologico dei coronavirus propri e di eventuali emergenti nella popolazione suina.

L'identificazione delle diverse specie virali è stata effettuata avvalendosi del protocollo "nested-RT-PCR pan-CoV" con l'amplificazione del gene RdRp che è stato successivamente sequenziato per la determinazione della specie virale coinvolta e l'esecuzione dell'analisi filogenetica. Le positività sono state analizzate in funzione di alcuni fattori determinanti, relativi a caratteristiche aziendali, animali e di contesto epidemiologico, per determinarne l'eventuale associazione statistica; questo obiettivo analitico è stato condotto sia univariatamente che costruendo un modello multivariabile tenendo conto del fattore di aggregazione rappresentantato dal sito di campionamento (azienda=fattore random).

Nessun campione è stato identificato positivo a SARS-CoV-2, suggerendo come il suino non abbia un ruolo epidemiologico nella diffusione di questo virus.

Sebbene con una prevalenza generalmente bassa, sono state rilevate le positività a due specie virali, PHEV (virus dell'encefalomielite emoagglutinante suina) e AlphaCoV1 (Alphacoronavirus 1), la cui diffusione è risultata associabile con la tipologia produttiva e le dimensioni aziendali con entrambi gli approcci statistici utilizzati (univariato e multivariabile). È stato inoltre osservato un andamento stagionale della prevalenza, individuando un picco di contagi nel periodo estivo per PHEV e nel periodo invernale per AlphaCoV1, ma, per il ridotto numero di aziende campionate, si rendono necessari ulteriori studi a riguardo.

L'assenza di segni clinici evidenti al momento del campionamento sommata ad una limitata variabilità dei ceppi circolanti osservata tramite l'analisi filogenetica dei campioni positivi può indicare una condizione di endemicità delle due specie virali. È però necessario approfondire gli studi in tal senso, in particolare per AlphaCoV1, sequenziando il gene S per poter distinguere la specie virale di appartenenza e definire meglio il quadro epidemiologico territoriale.

ABSTRACT

In the current pandemic context, several studies have been focused on detecting which animal species can be a potential reservoir for SARS-CoV-2. Pigs represent a species reared worldwide for food production and they have already been shown to be susceptible to six swine specific species of coronaviruses.

In this study, which is included in the research activities of a broader European project, a cross-sectional and a longitudinal study were conducted on a total of 18 pig farms in north-eastern Italy in order to investigate the epidemiology of specific and emerging coronaviruses in the pig population.

The detection of the different viral species was carried out through a "nested-RT-PCR pan-CoV" protocol targeting the RdRp gene, subsequently sequenced to identify the viral species and to perform viral phylogenesis. The epidemiological study was conducted to assess the association of prevalence data with some risk factors at farm (structural and managerial) and animal level; the analytical part was conducted firstly by means of univariate analysis and finally building a multivariable model, with the site of sampling (farms) included as the clustering factor.

No samples were identified positive for SARS-CoV-2, suggesting that pigs do not play an epidemiological role in the spread of this virus.

Although with a generally low prevalence, two viral species were detected, PHEV (porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus) and AlphaCoV1 (Alphacoronavirus 1). For both these viruses, prevalence was found to be associated with the type of production and farm size, either with the univariate approach, or in the multivariable model. A seasonal trend in prevalence was also identified, with a peak of cases in the summer for PHEV and in the winter for AlphaCoV1, but, due to the small number of farms that has been sampled, further studies will be necessary to make these findings more robust.

The absence of evident clinical signs at the time of sampling, as well as the low genetic variability of the circulating strains observed by the phylogenetic analysis, may indicate that the two viruses are in an endemic situation. However, it is necessary to carry out further studies, in particular for AlphaCoV1, by sequencing the S gene in order to determine its viral species and to better define the epidemiological situation at a geographical level.

INDICE

RIASSUNTO I

ABSTRACT III

1. INTRODUZIONE 5

1.1 Suinicoltura in Italia e nel mondo 8

1.2 Coronavirus suini 12

1.2.1 Virus della gastroenterite trasmissibile (TGEV) 16

1.2.2 Coronavirus respiratorio suino (PRCV) 17

1.2.3 Diarrea epidemica suina (PEDV) 17

1.2.4 Virus dell'encefalomielite emoagglutinante suina (PHEV) 18

1.2.5 Deltacoronavirus del suino (PDCoV) 19

1.2.6 Coronavirus della sindrome da diarrea acuta del suino (SADS-CoV) 20

1.3 Progetto ConVErgence e scopo della tesi 20

2. MATERIALI E METODI 23

2.1 Raccolta dei campioni 24

2.2 Processazione dei campioni 25

2.2.1 Estrazione dell'RNA 25

2.2.2 RT-PCR: Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction 27

2.2.3 Elettroforesi su gel 30

2.2.4 Sequenziamento e analisi filogenetica 31

2.3 Analisi dei dati 32

3. RISULTATI E DISCUSSIONE 34

3.1 Caratterizzazione delle aziende campionate 35

3.2 Valutazione epidemiologica dei fattori di rischio aziendali per l'infezione da PHEV e AlfaCoV1 38

3.3 Analisi della prevalenza di PHEV e AlphaCoV1 nelle aziende campionate 40

3.4 Analisi delle prevalenze di PHEV e AlphaCoV1 nello studio trasversale 43

3.5 Output modello multivariabile 48
3.6 Analisi dell'effetto stagione per le infezioni da PHEV e AlphaCoV1 49
3.7 Considerazioni aggiuntive 51
3.7.1 Relazione tra segni clinici e positività 51
3.7.2 Tamponi (rinofaringeo e rettale) come matrice per la diagnosi diretta 52
3.8 Analisi filogenetica 53
4. CONCLUSIONI 56
BIBLIOGRAFIA & SITOGRAFIA 59
ALLEGATI 63
Allegato n° 1: Etichette dei dati e dei metadati utilizzate nel database finale 63
RINGRAZIAMENTI 65

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi tre anni, la società in cui viviamo è stata pesantemente influenzata dalla diffusione della pandemia da SARS-CoV-2, che ha portato ad uno stravolgimento dello stile di vita di tutta la popolazione mondiale. L'origine di questo virus è stata localizzata in Cina, in particolare a Wuhan, dove è iniziata la sua espansione grazie all'elevata trasmissibilità anche da persone asintomatiche (Johansson et al., 2021).

Il primo caso fuori dal territorio cinese è stato identificato in Thailandia il 14 gennaio 2020, mentre in Italia, il 31 gennaio 2020, sono stati rilevati positivi due turisti cinesi all'ospedale Spallanzani di Roma e il 21 febbraio 2020 è risultato positivo un uomo residente a Codogno (LO). Dopodiché, la situazione è peggiorata rapidamente, arrivando alla decisione di istituire, come misura di controllo, un lockdown generale dell'intero Paese a partire dal 9 marzo 2020, che si è prolungato fino al 4 maggio 2020, quando il numero di casi andava via via riducendosi. L'11 marzo l'OMS ha dichiarato il raggiungimento della fase pandemica per la diffusione di questo nuovo coronavirus.

A partire dal mese di gennaio 2021 è iniziata l'imponente campagna vaccinale, che ha portato ad un miglior controllo dei casi clinici e della sintomatologia, anche se, con la comparsa di nuove varianti, la diffusione non si è mai del tutto arrestata. Le misure restrittive sono perdurate per tutto il 2021, anche se in maniera meno intensa rispetto all'anno precedente, mentre lo stato di emergenza è ufficialmente terminato il 31 marzo 2022.

Questo evento pandemico ha portato a gravi conseguenze economiche e sociali: la chiusura delle attività e degli eventi pubblici ha causato a una riduzione della produzione nazionale di beni ed un calo dello stato di salute psicologica generale della popolazione, a partire dai più giovani che non hanno potuto seguire le lezioni in presenza a scuola, fino ai più anziani che sono stati impossibilitati a vedere i propri cari. A livello sanitario, fino ad oggi in Italia sono stati registrati più di 26 milioni di casi totali con più di 191'000 decessi (https://covid19.who.int/region/euro/country/it, ultimo accesso 24 settembre 2023).

La gravità e la portata globale di tale situazione hanno spinto la ricerca scientifica ad approfondire la comprensione del SARS-CoV-2, in modo da imparare a gestirlo correttamente e comprendere i fattori di rischio più importanti per la sua diffusione: le fonti di infezione, la trasmissibilità, l'origine dell'agente eziologico e la sua capacità di compiere spillover da uomo ad animale e viceversa. La famiglia virale a cui appartiene il SARS-CoV-2 è già conosciuta da diversi decenni ed è capace di colpire una grande varietà di specie grazie alla sua spiccata adattabilità dovuta alle mutazioni del filamento di RNA che si verificano durante le fasi di

replicazione, rendendola potenzialmente in grado di attuare il salto di specie tra un ospite animale ed un altro (Thakor et al., 2022).

L'EFSA ha altresì stimato che tra un terzo e la metà delle malattie infettive che colpiscono l'uomo abbia un'origine zoonotica e per questo motivo la fauna, sia selvatica che domestica, sta acquisendo un ruolo sempre più centrale nella sanità pubblica. Anche nel caso di Covid-19 ci sono forti sospetti che il progenitore derivi dal mondo animale. Infatti, diversi studi supportano l'origine di SARS-CoV-2 a partire da ceppi SARS-like, che risultano ampiamente diversificati in alcune specie di pipistrelli appartenenti al genere *Rhinolophus*. Tuttavia, i dati disponibili ad oggi non risultano sufficienti ad escludere completamente la possibilità che il virus fosse stato creato artificialmente in laboratorio e poi accidentalmente uscito dalla struttura di biocontenimento (Domingo, 2022). Nonostante questo, l'ipotesi di una fuga da un laboratorio è poco probabile e non si basa su evidenze scientificamente valide mentre l'origine zoonotica dei coronavirus umani è fortemente supportata anche per gli altri virus, tra cui SARS-CoV, MERS-CoV, 229E e NL63 che si sono probabilmente evoluti nell'ordine Chiroptera, OC43 sembra derivare dal coronavirus bovino, mentre HKU1 è maggiormente correlato a virus rilevati nei roditori. Se da una parte questi virus sono ora completamente adattati alla popolazione umana e si sono differenziati dai corrispettivi animali, per il MERS-CoV i camelidi fungono tutt'oggi da vera specie reservoir (Abdelrahman et al., 2020). Inoltre, è opportuno sottolineare come nonostante i pipistrelli ospitino coronavirus geneticamente molto simili a virus umani quali SARS-CoV e SARS-CoV-2, non è chiarito se questi siano i reali progenitori o invece vi sia stato il passaggio in un ospite intermedio di diversa specie prima di raggiungere l'uomo. Nello studio di Domingo del 2022, ad esempio, si ritiene valida l'ipotesi che il pangolino sia stata la specie intermedia dove il virus è potuto mutare e diventare capace di infettare l'uomo. Infatti, questi animali mantengono in natura un ceppo di SARS-like coronavirus altamente correlati al ceppo pandemico, soprattutto a livello della porzione che codifica per la "*receptor binding domain* – RBD", ovvero quella porzione della proteina spike di superficie che si lega ai recettori cellulari mediandone l'infezione.

Indipendentemente dalla reale catena di diffusione, stante la potenziale capacità di saltare da una specie animale a quella umana e viceversa e considerando che l'uomo è frequentemente esposto allo stretto contatto con gli animali, soprattutto domestici, fin da subito c'è stato interesse nel capire se qualche altra specie potesse essere in grado di ospitare ed amplificare il nuovo virus. Infatti, sono state rilevate delle positività in molteplici specie, sia di animali domestici come gatti, cani e visoni che selvatici e non convenzionali quali scimmie, leoni, tigri e cervi dalla coda bianca (Sharun et al., 2021). Per alcune di queste è stata dimostrata la loro

scarsa se non nulla importanza epidemiologica, come nel caso dei felini domestici: dopo la rilevazione di alcune positività al virus in animali di proprietà di persone infette, c'è stata la paura che potessero ritrasmettere l'agente all'uomo, ma il fatto non si è verificato (Sharun et al., 2021). Diverso è stato invece il caso dei visoni, che si sono dimostrati essere capaci di amplificare il virus e poi ritrasmetterlo all'uomo, manifestando dunque il potenziale a diventare un efficace reservoir animale con conseguenze molto gravi per la salute pubblica. Infatti, in Danimarca hanno anche determinato lo sviluppo e la diffusione di una variante virale, in quanto nella replicazione nella nuova specie ospite il virus aveva subito delle mutazioni che poi si sono mantenute (Sharun et al., 2021), creando un potenziale rischio di minor efficacia dei vaccini che si stavano sviluppando. Per paura che potessero nascere nuovi ceppi più virulenti e resistenti, la premier danese Wette Frederiksen ha ordinato la soppressione degli animali e la chiusura di tutti gli allevamenti del Paese, causando l'abbattimento di 17 milioni di esemplari e a perdite economiche attorno ai 2'500 milioni di euro (AGI, 2022). Il divieto di allevare visoni è decaduto il 1° gennaio 2023, quando sono state riaperte alcune strutture con l'accasamento di circa 10'000 nuovi animali per cercare di far ripartire il mercato delle pellicce.

Anche in Italia sono stati segnalati tre focolai di Covid-19 negli allevamenti di visoni da inizio pandemia, portando all'abbattimento di migliaia di esemplari. La decisione di tali interventi di sanificazione è descritta nell'Ordinanza del 21 novembre 2020, in cui viene ordinato all'articolo 2, comma 3, che "In caso di conferma della malattia, i visoni dell'allevamento sono sottoposti ad abbattimento, con metodi eutanasici, e distruzione". Successivamente, con la Legge di bilancio del 30 dicembre 2021 all'articolo 1, comma 980-984, il parlamento ha ordinato il divieto di allevare, far riprodurre in cattività, catturare e uccidere visoni, volpi, cani procione, cincillà e di animali di qualsiasi altra specie per la finalità di ricavarne pelliccia entro il 30 giugno 2022. Il conseguente danno economico a seguito di tale decisione è evidente, ma essendo quella delle pellicce una filiera con un limitato numero di animali, le effettive perdite sono state marginali.

C'è invece una maggior preoccupazione per altri animali allevati a fini alimentari che impattano pesantemente sull'economia italiana, ovvero i suini. Essi sono largamente allevati per la produzione di carne, tanto che sono al secondo posto come numero di capi dopo gli avicoli. In aggiunta a ciò, alcuni anni fa si sono già dimostrati essere una fonte di infezione per agenti virali zoonotici, come nel caso del virus influenzale di tipo A (famiglia *Orthomyxoviridae*), sottotipo H1N1, che nel 2009 ha causato la prima pandemia del XXI secolo, diventando capace di infettare l'uomo dopo aver effettuato il salto di specie partendo proprio da questi animali.

Oltre a quella *Orthomyxoviridae*, i suini sono ospiti naturali di numerose famiglie virali, tra cui la *Coronaviridae*, cui prestare attenzione ancora oggi, in considerazione delle nuove specie virali ad essa appartenenti che si sono sviluppate negli ultimi anni. Considerando inoltre le conseguenze dovute alla diffusione del Covid-19 tra la popolazione di visoni, l'interesse della comunità scientifica si è anche concentrata sui suini, cercando di determinare se fossero o meno in grado di fungere da serbatoio o da specie di passaggio per la coabitazione in ambienti con alcune specie di chirotteri e se costituissero un rischio per la sanità pubblica e animale, in modo da intervenire preventivamente. Lo scopo del progetto in cui si inserisce questa tesi è proprio verificare quali coronavirus circolano nella specie suina e verificare se possa essere considerata una specie di ulteriore spillover per SARS-CoV-2.

1.1 Suinicoltura in Italia e nel mondo

Negli ultimi decenni, la suinicoltura ha avuto una forte evoluzione, passando da un modello più estensivo ad uno intensivo per poter soddisfare la domanda crescente di carne suina, portando ad un calo del numero totale di allevamenti italiani, i quali però sono diventati più estesi e con un numero maggior di animali in ogni sito produttivo. La maggior parte dei suini (75-80%) viene allevata nel nord Italia, in particolare in Lombardia, Emilia-Romagna, Piemonte e Veneto, anche se in una percentuale minore di allevamenti rispetto al totale (23%), che conta un 54% di questi situati al sud e il rimanente 23% nel centro Italia (Tabella 1, Anagrafe Zootecnica Nazionale).

Tabella 1. Patrimonio zootecnico suino suddiviso per regione (anagrafe zootecnica nazionale, aggiornamento del 30/06/23).

DATA RIFERIMENTO	30/06/2023												
REGIONE	NUMERO ALLEVAMENTI	DI CUI CON SOLO CINGHIALI	DI CUI CON MAIALI E CINGHIALI	NUMERO CAPI	DI CUI CINGHIALI	DI CUI MAIALI	DI CUI GRASSI	DI CUI MAGRONI	DI CUI MAGRONCELLI	DI CUI LATTONZOLI	DI CUI SCROFE	DI CUI SCROFETTE	DI CUI VERRI
VALLE D'AOSTA	96	2	1	118	19	99	38	34	0	15	9	0	3
LIGURIA	247	10	10	443	66	377	169	26	15	30	93	14	30
BOLZANO	2,441	0	2	4,132	0	4,132	713	814	541	584	412	918	79
TRENTO	635	0	1	6,049	0	6,049	2,501	894	379	1,913	254	99	9
MOLISE	3,533	0	0	20,002	0	20,002	4,057	5,524	7,991	962	285	36	63
PUGLIA	785	4	7	39,826	70	39,756	6,776	7,737	2,826	10,385	1,370	317	278
LAZIO	11,459	59	37	40,649	710	39,939	15,158	6,491	4,949	9,456	2,964	432	418
CALABRIA	10,749	5	9	52,765	43	52,722	13,077	19,417	5,566	9,907	4,052	367	308
ABRUZZO	9,442	27	27	61,549	79	61,470	15,088	10,958	12,375	15,201	5,998	823	189
SICILIA	1,867	11	14	62,517	144	62,373	5,531	24,835	10,307	12,700	6,813	899	1,058
BASILICATA	711	6	8	66,830	36	66,794	12,785	18,400	11,181	17,799	4,134	2,148	176
CAMPANIA	17,774	25	15	83,602	62	83,540	21,122	22,379	10,384	21,553	5,061	838	186
MARCHE	4,776	25	16	103,527	187	103,340	25,542	23,048	9,856	38,203	4,461	2,048	169
TOSCANA	4,611	213	33	125,463	2,831	122,632	40,628	27,066	14,876	28,492	8,108	2,791	602
SARDEGNA	11,889	71	35	159,978	993	158,985	2,340	41,995	16,065	21,896	60,761	4,288	11,640
UMBRIA	4,648	39	2	187,487	695	186,792	50,801	50,039	19,112	51,481	11,159	3,784	257
FRIULI VENEZIA GIULIA	1,818	7	8	244,449	65	244,384	77,649	36,398	40,279	66,779	17,641	5,492	134
VENETO	8,092	21	16	730,501	206	730,295	191,736	118,187	73,387	284,926	46,490	12,885	394
EMILIA ROMAGNA	2,947	50	11	1,007,333	328	1,007,005	313,495	219,591	172,729	236,435	48,786	15,400	519
PIEMONTE	1,635	56	0	1,288,961	256	1,288,705	418,313	307,894	210,933	286,145	54,141	10,825	451
LOMBARDIA	6,625	25	4	4,070,097	150	4,069,947	1,191,288	968,421	777,037	862,390	221,327	47,626	1,858
Totali	**106,780**	**656**	**256**	**8,356,278**	**6,940**	**8,349,338**	**2,408,807**	**1,910,148**	**1,400,788**	**1,977,252**	**504,319**	**112,030**	**18,821**

Si può quindi dedurre che la struttura zootecnica del settore suinicolo sia molto diversa in base alla localizzazione geografica: al nord sono presenti pochi allevamenti di grandi dimensioni, mentre al sud la condizione è opposta, con tante strutture con un numero esiguo di animali. Dall'ultimo aggiornamento dell'Anagrafe Zootecnica Nazionale a giugno 2023, è stato stimato un patrimonio zootecnico di circa 8,4 milioni di suini e 106'000 allevamenti (Tabella 1).
La divisione dei capi e degli allevamenti nel territorio può anche far intuire come la modalità più diffusa sia quella di tipo intensivo. Infatti, il 71% degli animali cresce in aziende con più di 1000 capi e la tendenza probabilmente sarà simile anche nei prossimi anni. Questo sistema di allevamento è stato sviluppato conseguentemente alla crescita di domanda della carne suina avvenuta parallelamente all'industrializzazione e, nonostante tale richiesta sia attualmente in diminuzione, tanto che nell'ultimo anno è stata registrata una riduzione nel numero di capi allevati del 3,17% (circa 273'000 animali) rispetto a giugno 2022, ha ancora un importante impatto sulla realtà socioeconomica italiana. La diminuzione dei capi allevati può essere correlata ad una modificazione delle abitudini alimentari dei consumatori che prediligono sempre più le carni bianche perché percepite più salutari e per l'affermarsi di una diversa sensibilità in materia di salute, ambiente e benessere animale. Il trend potrebbe essere sovrapponibile in tutti i Paesi più industrializzati, mentre in quelli in via di sviluppo si prevede un notevole aumento del consumo di prodotti di origine animale nei prossimi anni, determinando un incremento dell'intensificazione per poter soddisfare la domanda.
Nel sistema intensivo che è andato sviluppandosi esistono due modalità principali di organizzazione aziendale: a ciclo aperto, in cui il settore riproduzione e il settore ingrasso sono separati e indipendenti e quindi vi sono aziende specializzate nella produzione di lattonzoli o lattoni mentre altre che li acquistano e li ingrassano fino al peso di macellazione; a ciclo chiuso, in cui un'unica azienda sono presenti entrambi i settori e le attività coesistono. L'organizzazione a ciclo aperto può essere a sua volta strutturata in filiera multisito, dove scrofaie, svezzatori e ingrassi sono controllati da un'unica industria che ne detiene la proprietà, ma distribuiti in siti produttivi tra loro isolati e geograficamente distanti. In particolare, per ogni scrofaia di filiera è presente una struttura piramidale costituita da 9 svezzatori e 16 ingrassi: questo permette di avere una rotazione tra interi capannoni, che vengono periodicamente svuotati una volta che il ciclo è completo garantendo un vuoto sanitario adeguato.
La gestione dei gruppi allevati può essere organizzata in diverse modalità, ma quella ad oggi più diffusa è una gestione a bande, in cui le scrofe, e di conseguenza tutti i suinetti che nascono, sono suddivise in gruppi omogenei in modo tale da avere una gestione più semplice e pianificabile. In particolare, in Italia, gli allevatori si stanno convertendo man mano alla

modalità a 3 settimane con 7 bande di scrofe, che risulta in un'organizzazione dei lavori aziendali molto routinaria e precisa a seconda del giorno della settimana (Tabella 2).

Tabella 2.Organizzazione del lavoro nella conduzione a 7 bande a 3 settimane (Fonte: Suivet)

<table>
<tr><th></th><th>SETTIMANA 1</th><th>SETTIMANA 2</th><th>SETTIMANA 3</th></tr>
<tr><td>LUNEDÌ</td><td rowspan="3">Stimolazione scrofette</td><td rowspan="4">Fecondazione scrofe e scrofette</td><td rowspan="6">Parti</td></tr>
<tr><td>MARTEDÌ</td></tr>
<tr><td>MERCOLEDÌ</td></tr>
<tr><td>GIOVEDÌ</td><td>Svezzamento scrofe
Spostamento suinetti</td></tr>
<tr><td>VENERDÌ</td><td>Lavaggio e disinfezione sale parto</td><td></td></tr>
<tr><td>SABATO</td><td></td><td>Entrata scrofe in sala parto</td></tr>
<tr><td>LAVORO DOMINANTE</td><td>Svezzamenti</td><td>Fecondazioni</td><td>Parti</td></tr>
</table>

L'evoluzione verso l'organizzazione intensiva a bande degli ultimi decenni ha sicuramente portato a diversi vantaggi, tra cui: 1) una miglior gestione delle strutture, con la possibilità di automatizzare i lavori, andando a ridurre le attività da svolgere manualmente da parte degli operatori; 2) una maggior efficienza nell'utilizzo delle risorse, con incremento dell'indice di conversione alimentare grazie all'utilizzo di diete bilanciate per avere la massima resa; 3) una miglior gestione delle deiezioni con possibilità di gestirne lo spargimento in ambiente più facilmente. L'intensivizzazione del sistema in bande comporta però inevitabilmente anche alcuni svantaggi: 1) il benessere animale deve essere salvaguardato e gestito garantendo gli arricchimenti ambientali minimi obbligatori per diminuire lo stress e rendere l'animale capace di manifestare i propri comportamenti naturali tipici; 2) l'aumento del numero di animali allevati per sito e la loro stabulazione in strutture concentrate in determinate aree del territorio favorisce una più efficace e rapida diffusione dei microrganismi, sia all'interno dell'allevamento che tra allevamenti delle vicinanze. L'aumento delle dimensioni delle popolazioni animali allevate inoltre va considerato assieme al fatto che il personale che le gestisce è costantemente in stretto contatto con gli animali, rappresentando quindi un fattore di rischio incrementale per la trasmissione di eventuali agenti di zoonosi, come verificatosi in passato con la pandemia influenzale del 2009.

Per i motivi sopraesposti, nel tempo si è resa necessaria l'implementazione di più stringenti misure di biosicurezza, soprattutto al fine di ridurre l'utilizzo di farmaci antimicrobici, per contrastare il fenomeno della antibiotico-resistenza e per garantire la salute agli animali

limitando la circolazione di agenti patogeni. La biosicurezza è "l'insieme delle misure gestionali e fisiche volte a ridurre il rischio di introduzione, sviluppo e diffusione delle malattie a, da o in: a) una popolazione animale, o b) uno stabilimento, una zona, un compartimento, un mezzo di trasporto o qualsiasi altro sito, struttura o locale" (Regolamento UE 2016/429). I fattori di rischio più importanti da controllare sono la rimonta esterna, il personale interno ed esterno che lavora a stretto contatto con gli animali, i camion per il trasporto, la prossimità con allevamenti vicini, la fauna selvatica, l'approvvigionamento di acqua e mangime, lo strumentario utilizzato nei vari settori (Alarcón et al., 2021). Ogni sistema di allevamento ha delle criticità e dei vantaggi riguardo la biosicurezza: gli allevamenti a ciclo chiuso hanno meno probabilità di introduzione di patologie tramite il trasporto, elemento invece molto impattante per le filiere multisito, che però hanno un minor rischio di trasmissione in popolazioni di suini di età diverse; gli ingrassi delle aziende a ciclo aperto hanno il rischio di acquisire animali con storie epidemiologiche diverse, rendendo i suini suscettibili ad agenti con cui non sono mai venuti a contatto.

Se le misure di biosicurezza sono fondamentali per il controllo della diffusione degli agenti patogeni, esistono altri fattori di rischio che possono favorire la loro permanenza e i loro effetti negativi sulla salute degli animali: densità animale troppo elevata, pavimentazione, clima, tipologia produttiva, possibilità di accedere o meno all'esterno. Tutti questi elementi assieme concorrono a determinare il livello di rischio sanitario a livello aziendale e una loro corretta gestione può migliorare le condizioni di allevamento e di conseguenza ridurre il rischio di insorgenza di focolai di malattie.

Ma perché il suino rappresenta una specie così importante nel contesto pandemico attuale? Esistono numerose famiglie virali che colpiscono questi animali e tra quelle più diffuse e rilevanti c'è la *Coronaviridae*: i coronavirus possono determinare gravi danni soprattutto per l'elevata morbilità, che diventa ancora più evidente in ambienti confinati in cui convivono un elevato numero di animali. La riduzione del numero totale di allevamenti e la loro transizione al sistema intensivo ha portato allo spostamento dei siti produttivi in aree contigue e vicine tra loro, aumentando il rischio di una diffusione più rapida dei patogeni, compresi i coronavirus. Attualmente sono conosciute sei specie di coronavirus in grado di infettare il suino che saranno successivamente approfondite singolarmente; data la loro intrinseca capacità a mutare e a ricombinare e visti anche gli eventi accaduti in passato con il virus influenzale, risulta importante non solo individuare e arginare le epidemie che possono derivare dalla diffusione di questi agenti patogeni, ma anche cercare di determinare la potenziale suscettibilità di tale specie

animale al SARS-CoV-2. Se dovesse dimostrarsi essere un buon reservoir come accaduto nel caso dei visoni potrebbe rappresentare un importante rischio per la salute pubblica e animale, nonché un grave problema di tipo economico per le perdite che ne conseguirebbero nel contesto produttivo dell'industria alimentare.

1.2 Coronavirus suini

I coronavirus suini sono stati identificati per la prima volta a metà degli anni '40, primo tra tutti il virus della gastroenterite trasmissibile (TGEV). Successivamente è seguita l'identificazione delle altre specie virali, fino ad oggi in cui è presente una classificazione più solida. Tali agenti virali hanno una diffusione mondiale e sono importanti per le perdite produttive che conseguono alla loro circolazione, in particolare tra i suinetti sotto scrofa in cui morbilità e mortalità possono arrivare anche prossime al 100% in popolazioni sieronegative (Vlasova et al., 2020).
La famiglia *Coronaviridae* comprende due sottofamiglie: *Coronavirinae*, composta dai quattro generi *Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus, Deltacoronavirus*, e *Torovirinae*, che comprende i generi *Torovirus* e *Bafinivirus*. In totale sono state identificate sei specie in grado di infettare il suino (Thakor et al., 2022), schematizzate in Figura 1:

- Virus della gastroenterite trasmissibile (TGEV)
- Coronavirus respiratorio suino (PRCV)
- Virus della diarrea epidemica suina (PEDV)
- Virus dell'encefalomielite emoagglutinante suina (PHEV)
- Deltacoronavirus suino (PDCoV)
- Coronavirus della sindrome da diarrea acuta suina (SADS-CoV)

La struttura virale è composta da una singola catena a RNA, con *envelope* derivato dalle cellule dell'ospite infettato, di dimensioni molto variabili che vanno da 60 a 160 nm di diametro comprendente quattro proteine strutturali principali: glicoproteina S di membrana (*spike*, che determina la caratteristica forma a corona visibile al microscopio elettronico); proteina E dell'*envelope* (fondamentale per la fase di assemblaggio); glicoproteina M di membrana; proteina N del nucleocapside. La proteina *spike* è la principale struttura immunogena, che permette l'adsorbimento e la fusione con le membrane dell'ospite, con tropismo tessuto-specifico e contro cui sono diretti gli anticorpi neutralizzanti (Thakor et al., 2022) e la più soggetta a mutazioni che favoriscono la capacità di adattamento alle diverse specie.

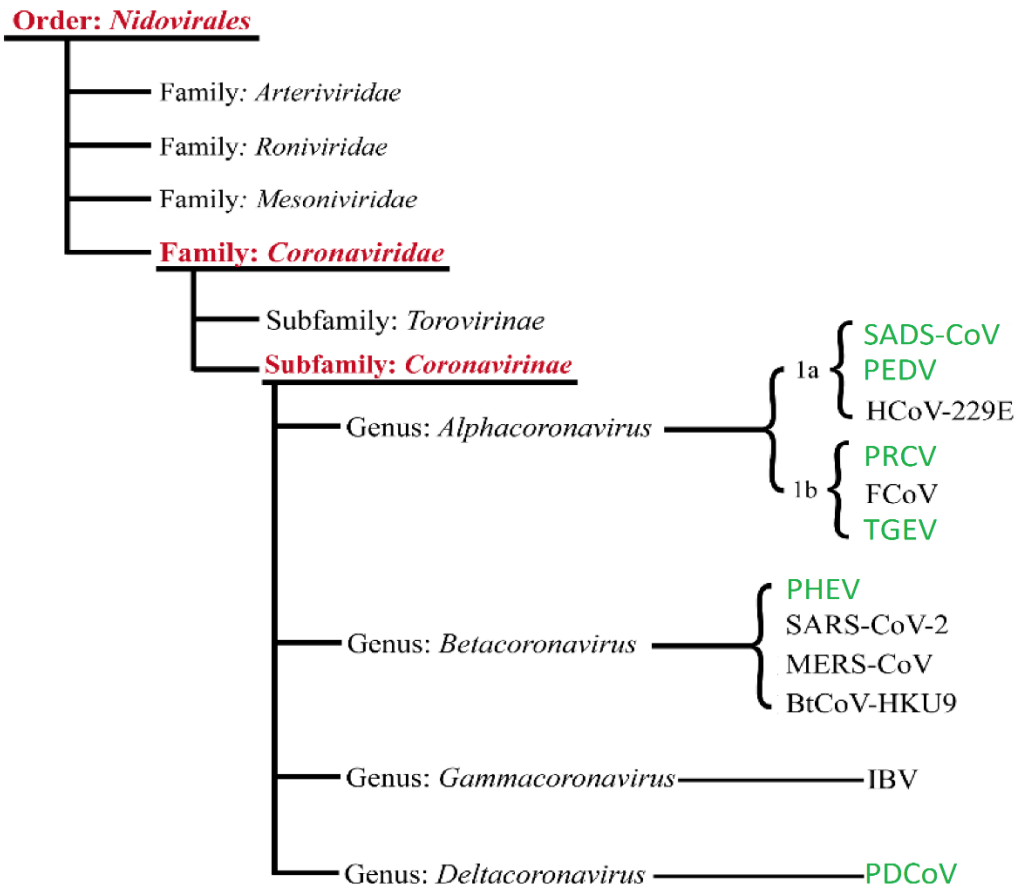


Figura 1. Classificazione schematica dei coronavirus. In verde sono evidenziati gli agenti che colpiscono il suino. Abbreviazioni: BtCoV, bat coronavirus; IBV, infectious bronchitis virus; FCoV, feline coronavirus (Immagine di Yan et al., 2022 *con modifiche).*

Come si evidenzia dalla Figura 2, il genoma è suddiviso in pochi tratti: dall'estremità 5' vi sono i geni ORF-1a e ORF-1b, che trasportano informazioni per la sintesi delle poliproteine (pp) non strutturali 1a e 1b, le replicasi, che vengono successivamente clivate in 16 singole proteine che comprendono proteasi, enzimi per la modificazione dell'RNA, elicasi e polimerasi utili per la trascrizione dei segmenti successivi. Nel tratto successivo sono presenti invece i geni per la codifica delle proteine strutturali (S, M, N, E) più alcuni geni accessori.

Tutti i coronavirus hanno dei tratti genomici in comune che condividono sequenze nucleotidiche simili: questo permette di sviluppare protocolli di diagnostica molecolare in grado di rilevare la maggior parte dei virus con una buona sensibilità. La differenziazione tra virus è possibile tramite amplificazione di tratti più o meno lunghi tramite RT-PCR (spesso utilizzando un approccio nested per aumentare la sensibilità) e sequenziamento delle porzioni genomiche amplificate. La maggior parte di queste metodiche, definite pan-coronavirus, è sviluppata sulla RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp), parte della poliproteina 1b. Ciò è dovuto al fatto che questa porzione genomica risulta particolarmente conservata all'interno della famiglia virale, facilitando il disegno dei primers per l'amplificazione. Grazie all'utilizzo di queste metodiche

è possibile amplificare e quindi successivamente sequenziare i coronavirus che rientrano in tutti e quattro i generi, comprendendo non solo quelli che colpiscono i suini, ma anche gli altri animali e l'uomo.

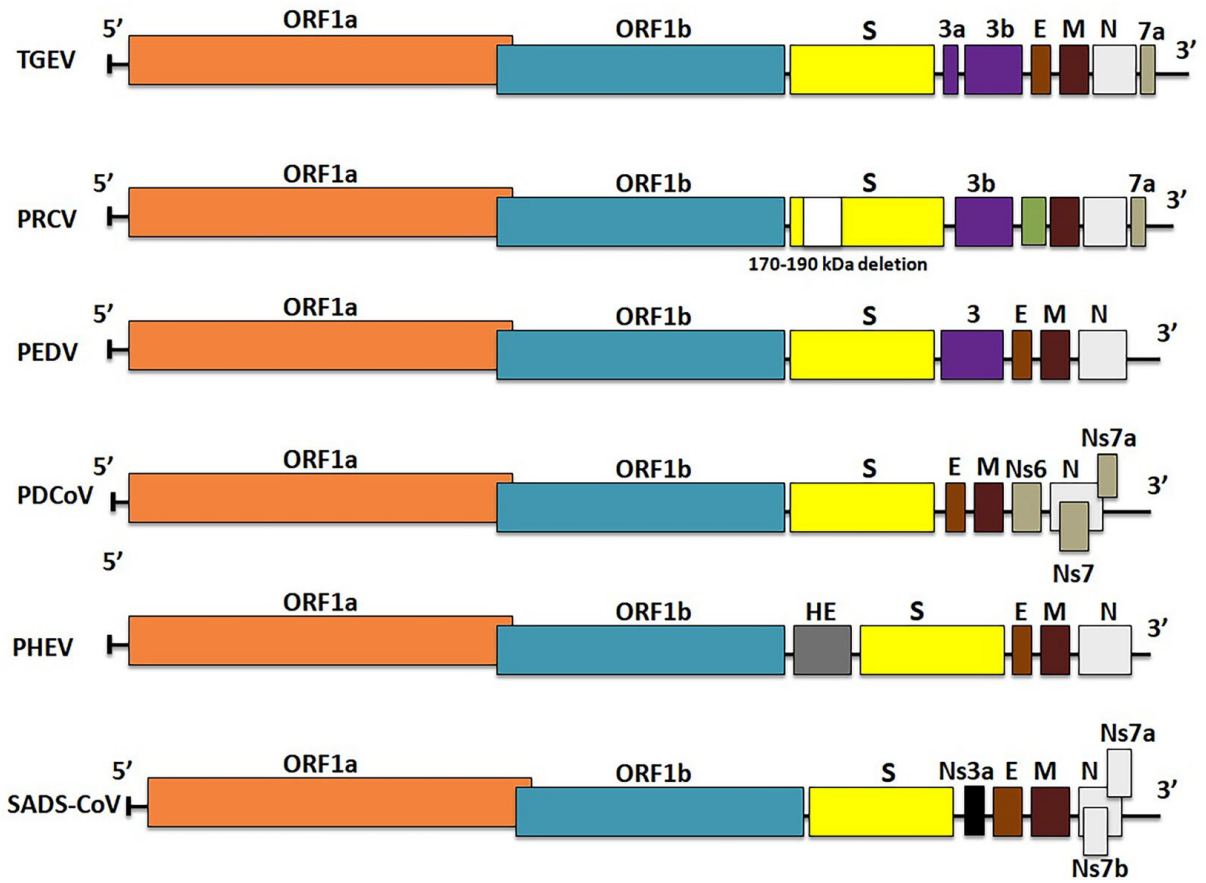


Figura 2. Schema della struttura genica dei differenti coronavirus suini. S, gene spike; E, envelope; M, membrana; N, nucleocapside; HE, emoagglutina-esterasi; Ns3a, Ns6, Ns7, Ns7a, Ns7b. 3, 3a, 3b sono geni accessori. Thakor et al., 2022.

Dopo l'interazione tra la proteina S e il recettore della cellula ospite, l'RNA viene liberato nel citoplasma cellulare e immediatamente vengono tradotti i due segmenti ORF-1a e ORF-1b, andando a produrre tutte le proteine non strutturali utili per la replicazione virale. La traduzione e l'assemblaggio delle proteasi è seguito dalla sintesi dell'RNA virale e, una volta finita la replicazione, il virus viene assemblato con la mediazione della proteina M che regola le interazioni tra le proteine, ed attraverso un processo di esocitosi viene liberato dalla cellula (Thakor et al., 2022).

La maggior parte di questi patogeni ha un miglior tropismo per l'epitelio intestinale, determinando diarrea acquosa grave, vomito, anoressia, disidratazione, acidosi metabolica e iperkalemia, in particolare nei neonati dove si può arrivare ad una mortalità che può raggiungere il 100%. Delle eccezioni sono rappresentate dal PRCV che ha un maggior tropismo per

l'apparato respiratorio, determinando danni meno gravi e una mortalità che si ferma a valori massimi del 40% (Niederwerder & Hesse, 2018) e dal PHEV che colpisce anche il sistema nervoso centrale. Tuttavia, è opportuno sottolineare come la maggior parte di questi virus sia associata a sintomatologia blanda o nulla. Fanno eccezione PEDV e SADS-CoV, virus epidemici a morbosità elevata.

La diffusione della gran parte di essi è ubiquitaria. In Italia, nonostante manchino studi epidemiologici mirati alla determinazione della sua diffusione, il coronavirus suino che causa maggiori danni sembra essere PEDV. Altri coronavirus come TGEV e PRCV sono molto diffusi nel nostro territorio, ma il loro impatto dal punto di vista economico è inferiore poiché dimostrano minore patogenicità conseguente ad una più solida immunità di popolazione derivante dalla loro prolungata circolazione e dalle correlazioni genetiche e antigeniche che li caratterizzano. Questi fattori non sono attribuibili ad altri coronavirus di più recente introduzione quale il PEDV.

La Tabella 3 riassume le caratteristiche principali e la capacità di infettare altre specie animali dei sei coronavirus suini che sono successivamente approfonditi singolarmente.

Tabella 3. Caratteristiche principali dei coronavirus suini (Linda J. Saif et al., 2019).

SPECIE VIRALE	FORMA CLINICA PREVALENTE	DIFFUSIONE	SPILLOVER
TGEV	Enterica	Europa, USA, Asia	No
PRCV	Respiratoria	Europa, USA, Asia	Sì: cani, gatti, volpi
PEDV	Enterica	Mondiale	No
PHEV	Mista	Mondiale	No
PDCoV	Enterica	USA, Canada, Cina, Corea, Vietnam, Tailandia	Sì: gatto leopardo asiatico, tasso furetto della Cina
SADS-CoV	Enterica	Cina	Sì: chirotteri

1.2.1 Virus della gastroenterite trasmissibile (TGEV)

Appartenente al genere *Alphacoronavirus*, il virus della gastroenterite trasmissibile suino (TGEV) è stato isolato la prima volta nel 1946 negli Stati Uniti, mentre ad oggi è diffuso a livello mondiale, Italia compresa. Da uno studio effettuato in Campania, questo virus risulta essere il secondo coronavirus più diffuso dopo il PEDV con una prevalenza del 5,5% (Ferrara et al., 2023).

Il TGEV colpisce suini di tutte le età, ma i danni maggiori si evidenziano in suinetti di età inferiore alle 2 settimane, dove si possono raggiungere mortalità del 100%, mentre in suini oltre le 5 settimane raramente vengono riscontrati segni clinici evidenti. Esistono due forme epidemiologiche, che si differenziano in base alla sieropositività dei gruppi coinvolti: la forma epidemica e quella endemica. La prima si palesa nei casi di sieronegatività degli animali e si manifesta velocemente, soprattutto in inverno, con la comparsa di sintomi quali: inappetenza, vomito e diarrea in tutti gli animali, con aggiunta di una disidratazione importante nei suinetti che causa mortalità molto elevate. La seconda forma è tipica degli allevamenti in cui il virus è già presente e continua a circolare, in particolare dove vi sono un numero elevato di parti o di ingressi di animali dall'esterno che risultano essere sieronegativi. I segni sono meno evidenti, le scrofe sono spesso asintomatiche e trasmettono l'immunità ai suinetti, limitando le mortalità al 10-20% entro le 2 settimane di vita (Saif et al., 2019).

Per arrivare alla diagnosi eziologica è necessario associare la sintomatologia clinica ai test laboratoristici, in quanto i segni da soli non sono patognomonici, bensì comuni ad altri patogeni intestinali (rotavirus, PEDV, PDCoV, coccidi). Si rende quindi necessaria la ricerca degli antigeni o degli acidi nucleici virali, isolamento virale o ricerca anticorpale:

- Ricerca antigeni: immunoistochimica, immunofluorescenza in campioni tissutali fissati in formalina o congelati a cui si applicano anticorpi marcati contro la proteina N; test ELISA in colture cellulari, feci o contenuto intestinale (Sestak et al., 1999).
- Ricerca acidi nucleici virali: RT-PCR e real-time RT-PCR sono utilizzati per differenziare le singole specie di coronavirus.
- Isolamento virale: le linee cellule renali, tiroidee e testicolari suine sono le più utilizzate per evidenziare l'effetto citopatico dato dall'infezione.
- Sierologia: la ricerca anticorpale è complicata dal fatto che TGEV e PRCV stimolano la produzione di anticorpi neutralizzanti qualitativamente e quantitativamente molto simili (Saif et al., 2019), rendendo difficile la differenziazione dei due agenti.

1.2.2 Coronavirus respiratorio suino (PRCV)

Il PRCV è una variante del TGEV sviluppatasi a seguito di delezioni a livello del gene S e ORF3 che infetta soprattutto il tratto respiratorio avendo maggior tropismo verso l'epitelio respiratorio dove avviene la sua replicazione, con una limitata azione a livello gastroenterico e una scarsa escrezione fecale. Il primo isolamento risale al 1984 in Belgio, seguito poi da Stati Uniti, Canada, Giappone, Croazia e Slovenia (Beltz, 2023). Nel 2012 è stata inoltre isolata una variante chimerica di questi due agenti, il SECoV (swine enteric coronavirus).

I suini colpiti da questo virus sono altresì produttori di anticorpi neutralizzanti il TGEV (Saif et al., 2019), determinando una maggiore difficoltà a discriminare i due agenti tramite i test anticorpali sierologici. A questo ha però conseguito l'immunizzazione degli animali ad entrambi gli agenti virali, favorendo la scomparsa quasi totale dell'originale TGEV (Martelli et al., 2008).

Sono interessati suini di tutte le età che manifestano spesso forme subcliniche, ma favoriscono comunque la diffusione virale tramite la via aerogena. La sintomatologia è normalmente poco evidente e autolimitante, con animali che presentano tosse, respiro addominale, dispnea, depressione, anoressia e calo delle performance produttive. Può evolvere ad una forma più grave quando coesistono altri patogeni virali o batterici, come nel caso di coinfezione con PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus).

La diagnosi eziologica si effettua in modo simile al TGEV, andando però ad utilizzare come matrici le secrezioni respiratorie. Essendo tra loro molto simili, la differenziazione tra le due specie virali non è possibile tramite la classica RT-PCR, in quanto l'unico modo per discriminarle è caratterizzando la proteina *spike* o eseguendo un sequenziamento dell'intero genoma virale.

Oltre al suino, anche altre specie sembrano poter essere dei potenziali *carrier*: cani, gatti e volpi sono in grado di eliminare il virus nelle feci per periodi di tempo variabili e quindi sono potenzialmente in grado di infettare altri animali (Saif et al., 2019).

1.2.3 Diarrea epidemica suina (PEDV)

Il PEDV è stato isolato la prima volta nel 1978 a seguito di episodi di gravi forme diarroiche in suini nella fase di ingrasso e di finissaggio in Inghilterra nel 1971, che poi si sono diffuse a tutto il territorio europeo. In Italia sembra essere la specie predominante, come attestato dai numerosi studi sulla sua prevalenza e controllo. Nel 2006 è stato isolato questo virus dopo diversi anni di assenza (Martelli et al., 2008), mentre non sono stati registrati altri casi di epidemia a partire

dal 2013 (Beltz, 2023). In uno studio di Ferrara et al. del 2023, nella regione Campania è stata trovata una sieroprevalenza del 14,8% rappresentando la specie di coronavirus più diffusa nel territorio campano.

PEDV ha causato gravi perdite in Europa, colpendo soprattutto i suinetti, e in Asia, particolarmente in Cina, che nel 2010 ha registrato la perdita di più di 1 milione di suinetti in un solo anno (Sun Rui-Qin et al., 2012). Quest'ultimo episodio è stato ricondotto ad una variante emergente dello stesso virus, che differisce dal PEDV classico per inserzioni e delezioni nel gene S sviluppatesi probabilmente per il largo uso di vaccini vivi-attenutati, i quali hanno ricombinato con il ceppo originario (Beltz, 2023). Esso a sua volta viene diviso in due sottogruppi: non-S INDEL (a maggior virulenza) e S-INDEL.

Ad oggi PEDV è diffuso a livello mondiale: in Europa si crede siano circolanti entrambi i ceppi, anche se, dopo la comparsa della mutazione, il virus primario non è più stato più ricercato e la sua prevalenza è sconosciuta; in Asia il non-S INDEL ha portato a perdite importanti, così come negli Stati Uniti dove, tra il 2013 e il 2014, ha causato la morte di circa 7 milioni di suinetti (Beltz, 2023; Saif et al., 2019).

La sintomatologia è simile al TGEV, con manifestazioni cliniche quali diarrea, vomito, anoressia, depressione del sensorio e morte nei suinetti entro una settimana per disidratazione. Spesso è una condizione autolimitante e, dopo che le scrofe acquisiscono l'immunità e la trasmettono ai suinetti passivamente, si evidenziano la presenza di diarrea ricorrente nei suini svezzati ma con livelli di mortalità più limitate. Anche la diagnosi si effettua in modo sovrapponibile alle altre specie, associando i segni clinici ai test laboratoristici quali IF, IHC, RT-PCR, real-time RT-PCR ed ELISA.

1.2.4 Virus dell'encefalomielite emoagglutinante suina (PHEV)

Il PHEV, responsabile della malattia chiamata "*vomiting and wasting disease*", è stato identificato la prima volta in Canada nel 1962 in suinetti che presentavano encefalomielite (Greig et al., 1971) e successivamente in Inghilterra dove i sintomi erano invece anoressia, depressione, vomito e deperimento, senza evidenza di segni neurologici (Cartwright et al., 1969). Questo suggerisce che la patologia può manifestarsi in due forme cliniche ben distinte, anche se la specie virale è la stessa. Ad oggi il virus è diffuso a livello mondiale, con casi accertati in Europa, Stati Uniti, Canada, Argentina, Giappone, Taiwan e Australia (Saif et al., 2019). Normalmente i sintomi compaiono in suinetti di età inferiore alle 3-4 settimane nati da madri non immuni: siccome il sito primario di replicazione è il tratto respiratorio (Andries & Pensaert, 1980), i primi segni che si palesano sono starnuti e tosse tramite cui il virus viene

trasmesso. Seguono poi o le forme gastroenteriche caratterizzate da vomito incoercibile dopo il pasto con conseguente cachessia dovuta alla malnutrizione, oppure le forme neurologiche in cui si evidenziano andature anomale, ottusità del sensorio, tremori, nistagmo e opistotono dovuti all'encefalomielite. Le due manifestazioni cliniche possono coesistere nello stesso gruppo durante le fasi acute e si possono diffondere rapidamente raggiungendo morbilità e moralità del 100% in suinetti neonati. Nei suini adulti il segno più evidente è la paralisi dei posteriori, oltre a febbre, costipazione, tremori muscolari: la morbilità è molto inferiore e si aggira al 4%, anche se la mortalità può essere del 100% (Saif et al., 2019).
La diagnosi può essere eseguita tramite isolamento virale, IHC, RT-PCR (Quiroga et al., 2008) a partire da campioni di tonsille, tronco encefalico e polmoni, oppure con virus neutralizzazione o inibizione dell'emoagglutinazione utilizzando il siero come matrice diagnostica (Sasaki et al., 2003).

1.2.5 Deltacoronavirus del suino (PDCoV)

Questa specie, relativamente recente, è stata isolata la prima volta in Cina nel 2012, poi in Ohio nel 2014. Ad oggi risulta essere circolante negli Stati Uniti, Canada e in Asia, soprattutto in Corea, Cina, Tailandia, Vietnam (Dong et al., 2007). L'origine virale non è ancora chiara. Infatti, il genere *Deltacoronavirus* è composto per lo più da virus che infettano l'avifauna anche se prima di PDCoV alcuni virus appartenenti a questo genere sono stati identificati nei mammiferi, in tamponi rettali del gatto leopardo asiatico (*Prionailurus bengalensis*) e del tasso furetto della Cina (*Melogale moschata*) nel 2005-2006 (Dong et al., 2007), anche se le prevalenze a livello di fauna selvatica sono comprese tra 1% e 2,5% (Beltz, 2023).
La sintomatologia è sovrapponibile agli altri coronavirus enterici con diarrea acquosa acuta e conseguente disidratazione come segni clinici più evidenti ed è più grave nei suinetti, dove si può raggiungere una morbilità del 100% e mortalità del 40%. Normalmente è autolimitante, e la prevalenza diminuisce man mano che le scrofe acquisiscono immunità e la trasmettono ai suinetti (Saif et al., 2019). L'iter diagnostico da seguire è lo stesso riportato per il TGEV e PEDV, associando le rilevazioni cliniche ai test laboratoristici.

1.2.6 Coronavirus della sindrome da diarrea acuta del suino (SADS-CoV)

Il SADS-CoV è il coronavirus suino più recente, scoperto in Cina nel 2017, dove ha causato una grave epidemia nel sud del Paese determinando la morte di più di 24'000 suinetti (Pan et al., 2017). Una seconda ondata si è diffusa nel 2019, causando la perdita di circa 2000 suinetti in un allevamento vicino all'area interessata due anni prima (Zhou et al., 2019).
La particolarità sta nel fatto che questa specie sembra essere originata da un coronavirus dei pipistrelli, l'HKU2, dai quali è stato poi trasmesso ai suini (Thakor et al., 2022). Dal sequenziamento è risultato che i due agenti hanno la stessa struttura genica, fatta eccezione per la porzione amino-terminale del gene S. Qui sono state riscontrate un totale di 75 sostituzioni e 2 inserzioni amminoacidiche, le quali possono verosimilmente essere considerate la causa dell'adattamento alla nuova specie. I primi casi sono stati isolati in quattro allevamenti suinicoli a partire dal materiale fecale di suinetti che presentavano grave diarrea e vomito che ne aumentava notevolmente la mortalità (Pan et al., 2017). Per limitare le perdite durante la prima ondata, gli intestini dei suinetti morti in fase acuta sono stati omogeneizzati, filtrati, centrifugati e inattivati, per poi essere forniti alle scrofe gravide come alimento in modo da favorire il passaggio degli anticorpi materni ai futuri neonati. Invece, durante la seconda epidemia, la mortalità è stata arrestata grazie all'introduzione di un vaccino inattivato propagato in vitro (Zhou et al., 2019).

1.3 Progetto ConVErgence e scopo della tesi

Nel contesto appena descritto è quindi possibile capire lo scopo del progetto in cui si è inserita questa tesi. L'uomo è attualmente sensibile al SARS-CoV-2 e lavora a stretto contatto con gli animali, ponendo il rischio di potenziale passaggio ad altra specie di questo patogeno. L'agente in questione è naturalmente soggetto a frequenti mutazioni, che lo rendono potenzialmente in grado di adattarsi ad altre specie e di sviluppare nuove varianti. L'allevamento suinicolo rappresenta una realtà italiana e mondiale di importante impatto socioeconomico per il grande numero di animali che viene allevato ai fini alimentari. La struttura di allevamento intensivo e la concentrazione di allevamenti in determinate aree del territorio può favorire la l'amplificazione virale e la possibilità di diffusione dei coronavirus anche nelle zone limitrofe. Infine, i suini in passato si sono dimostrati essere un ottimo serbatoio per altre zoonosi virali come l'influenza e ospitano già diversi coronavirus propri.

In alcuni studi sperimentali con inoculazione del SARS-CoV-2 nei suini (Pickering et al., 2021) è stata rilevata la suscettibilità degli animali, così come è stato dimostrato come in vitro le colture cellulari siano sensibili all'infezione (Wan et al., 2020). In altri non è stato dimostrato (Buckley et al., 2021; Shi et al., 2020), il che indica la necessità di ulteriori approfondimenti in questo ambito, soprattutto in condizioni diverse rispetto l'inoculazione sperimentale. Visto quanto già accaduto con i visoni durante la pandemia, che ha portato all'abbattimento di milioni di animali per ridurre il rischio sanitario con pesanti conseguenze economiche, l'Unione Europea ha finanziato il progetto ConVErgence, a cui hanno aderito l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (ISZVE, capofila), l'Erasmus Medical Center di Rotterdam (Paesi Bassi) e l'Università di Sussex (Regno Unito).

La ricerca nel suo complesso ha l'obiettivo di valutare la possibilità di trasmissione dei coronavirus sia dell'uomo che dei chirotteri ai suini, al fine di poterne valutare il rischio e gli eventuali determinanti causali di infezione, concentrando gli studi al nord-est Italia. In particolare, gli obiettivi possono essere riassunti come segue:

- identificare e caratterizzare i coronavirus presenti nei suini allevati nel nordest Italia, compresi eventuali virus emergenti;
- valutare la presenza di chirotteri nelle aziende suinicole del nordest Italia e nelle zone adiacenti;
- caratterizzare i fattori che condizionano la presenza dei chirotteri negli allevamenti suinicoli;
- identificare e caratterizzare i coronavirus che circolano nei chirotteri che trovano rifugio negli allevamenti o nelle zone adiacenti;
- valutare come la prevalenza dei coronavirus nei suini è influenzata dalla stagione, da fattori legati alla modalità di allevamento, da fattori di biosicurezza e/o dalla presenza di chirotteri in allevamento;
- utilizzare i dati raccolti in un modello matematico di infezione per effettuare una valutazione del rischio;
- analizzare il genoma dei coronavirus al fine di effettuare un'analisi filogenetica per valutare la presenza di varianti o ricombinazioni tra le specie isolate.

Al di là di tutti gli obiettivi specifici contenuti all'interno del progetto, questa tesi affronta due aspetti, in particolare:

1) la conduzione di uno studio longitudinale sui coronavirus presenti in un'azienda suinicola a ciclo aperto (scrofaia e svezzamento) localizzata a Rovigo, per la valutazione della variazione della prevalenza dei coronavirus nel corso di un anno solare. Rientrano nella tesi i campionamenti, le analisi diagnostiche nonché l'analisi dei dati;
2) la valutazione epidemiologica dei coronavirus circolanti in allevamenti suini nel nord-est Italia basata sui dati ottenuti in uno studio trasversale condotto in 18 aziende sul territorio e mirato alla determinazione di quali specie virali siano più diffuse e valutando eventuali fattori di rischio associati alla loro circolazione. Rientrano nella tesi l'analisi epidemiologica e l'analisi filogenetica dei campioni positivi, mentre i campionamenti e le analisi di laboratorio sono state condotte in una fase progettuale precedente.

2. MATERIALI E METODI

Il progetto iniziale di ricerca prevedeva il campionamento di due aziende per lo studio longitudinale nell'arco di un anno solare e di circa cento ulteriori sparse tra le regioni del Veneto e del Friuli-Venezia Giulia, in modo da poter ottenere una valutazione epidemiologica robusta. Alcune difficoltà logistiche sono però comparse durante lo studio dopo la sua pianificazione ostacolando il raggiungimento del target di aziende previsto. Al di là del perdurare della pandemia da Covid-19, che durante le diverse ondate ha limitato spostamenti e accessi alle strutture e della recente epidemia di influenza aviaria ad alta patogenicità (H5N1), la diffusione anche nel territorio italiano della Peste Suina Africana, prima nell'animale selvatico (cinghiale) poi anche nell'animale domestico (suino da allevamento rurale e commerciale), ha determinato l'impossibilità di accedere negli allevamenti da parte di operatori esterni, compresi i ricercatori, per ragioni di biosicurezza e per la paura dell'introduzione della patologia, cui conseguono ingenti danni diretti da malattia e forti limitazioni alla movimentazione animale per le zone coinvolte da focolai di infezione. Per queste ragioni, è stato possibile campionare solamente 18 aziende in totale, comprese entrambe quelle utilizzate ai fini dello studio longitudinale, limitando il campione e la conseguente analisi statistica inferenziale.

Le aziende seguite longitudinalmente sono localizzate una in provincia di Gorizia e una in quella di Rovigo, mentre le restanti 16 aziende sono sparse nel territorio delle regioni Veneto e Friuli-Venezia Giulia. Alla fase di campionamento presso gli allevamenti è seguita quella di laboratorio condotta presso le strutture dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie dove è stato estratto il materiale genetico, amplificato tramite RT-PCR e poi sequenziato per individuare la specie virale ed eseguire l'analisi filogenetica.

Il campionamento longitudinale presso l'azienda sita in provincia di Rovigo è stato seguito in prima persona in tutte le sue parti, mentre gli altri campionamenti sono stati effettuati da personale coinvolto da IZSVE nel progetto mettendo poi a disposizione tutti i dati ottenuti in un database.

Ulteriore azione progettuale ha riguardato la raccolta di informazioni (metadati) da parte degli allevatori delle aziende coinvolte, tramite la compilazione di un questionario riguardo l'organizzazione aziendale in generale e le misure di biosicurezza adottate e altre domande più specifiche al fine di individuare gli eventuali rischi connessi al Covid-19 come la presenza di operatori riconosciuti positivi, l'utilizzo o meno delle mascherine, il controllo temperature del personale prima di accedere ai siti produttivi. Queste informazioni sono state poi analizzate in funzione delle positività rilevate, in modo da individuare quali potessero essere i potenziali fattori associati alla diffusione virale.

2.1 Raccolta dei campioni

L'azienda oggetto di studio è stata un allevamento a ciclo aperto con sede a Rovigo, che cresce lattoni di razza Landrace danese fino al peso di circa 30 kg, i quali vengono poi venduti ai siti di ingrasso dove terminano il ciclo. Secondo quanto indicato dal proprietario, in totale sono presenti 4 verri, 940 scrofe, 85 scrofette (le quali sono stabulate in una struttura separata a qualche chilometro di distanza dall'allevamento principale) e 4600 lattonzoli. I campionamenti sono stati in totale quattro e sono stati svolti in quasi un anno solare a cavallo tra il 2022 e il 2023, in modo tale da valutare sia il periodo caldo in primavera-estate (25 maggio 2022, 19 luglio 2022) che quello freddo in autunno-inverno (4 ottobre 2022 e 31 gennaio 2023).
Una volta giunti sul posto, sono state attuate tutte le misure di biosicurezza esterna al fine di ridurre al minimo l'introduzione di patogeni nell'allevamento interessato.
I campioni raccolti consistevano in due tamponi rettali, due tamponi rinofaringei ed un prelievo sanguigno dalla vena giugulare. Il sangue, che è stato prelevato in provette a tappo rosso senza anticoagulante, è stato utilizzato per l'estrazione del siero e inviato poi all'Erasmus Medical Center di Rotterdam per eseguire le indagini sierologiche dirette a identificare la circolazione di SARS-CoV-2. I tamponi sono stati inseriti in provette eppendorf contenenti due sostanze diverse: la prima un terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) per l'isolamento virale in coltura cellulare, mentre la seconda una soluzione contenente RNA *later* per preservare l'eventuale materiale genetico presente fino ad un mese dopo il campionamento. Per questo progetto è stato utilizzato solamente il tampone inserito in RNA *later*.
Durante ogni giornata di lavoro sono stati raccolti 47 campioni, stratificati per gruppo di età rispettando la rappresentatività aziendale delle diverse classi e poi scelti in maniera casuale dai gruppi di età diverse. In particolare, per ciascun giorno sono stati prelevati:

- 7 campioni dalle scrofe dal reparto fecondazione per una maggior facilità di contenimento, essendo loro stabulate in gabbie singole;
- 10 campioni da suinetti per ogni settimana di età per un totale di 40 animali. Nel reparto di svezzamento, i lattoni della stessa settimana stabulavano in un unico capannone ed erano suddivisi in box multipli: sono stati prelevati 5 suinetti per ogni box selezionato, quindi in totale sono stati analizzati due box per ogni settimana d'età.

Durante la fase di campo, i campioni sono stati tenuti il più possibile al riparo dal calore tramite dei contenitori refrigerati, soprattutto nel periodo estivo, per preservarne l'integrità.
Per l'identificazione sono stati utilizzati dei codici alfanumerici: il numero indicava l'animale campionato, mentre la lettera la matrice. Con la lettera "R" sono state nominate le matrici rinofaringee, con la "G" quelle gastroenteriche, mentre il sangue è stato identificato solamente

con il numero non seguito da nessuna lettera. I primi 7 campioni appartenevano sempre alle scrofe, mentre gli altri ai suinetti in ordine di età.
Una volta concluso, le provette con i campioni contenuti in RNA *later* sono state inserite in dei contenitori termici per tenerli a temperatura di refrigerazione, mentre i tamponi in terreno DMEM sono stati conservati in contenitori con azoto liquido durante il trasporto fino alla sede centrale in IZSVE.

2.2 Processazione dei campioni

Finita la fase di campo, i campioni sono rimasti stoccati alla temperatura di -80°C per qualche mese nelle celle dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale a Legnaro per essere processati in seguito.
L'estrazione del primo campionamento è stata effettuata subito dopo l'uscita in campo e il materiale estratto è stato poi conservato presso la struttura fino al 24 ottobre 2022, quando è stata effettuata l'RT-PCR. Tutti gli altri sono stati processati a partire dal 23 gennaio 2023, concludendo le analisi l'8 febbraio 2023.
La processazione è stata suddivisa in quattro fasi:

1. Estrazione dell'RNA dai campioni raccolti.
2. Effettuazione dell'RT-PCR seguendo un protocollo a due step.
3. Effettuazione dell'elettroforesi su gel.
4. Sequenziamento e analisi filogenetica dei campioni risultati positivi.

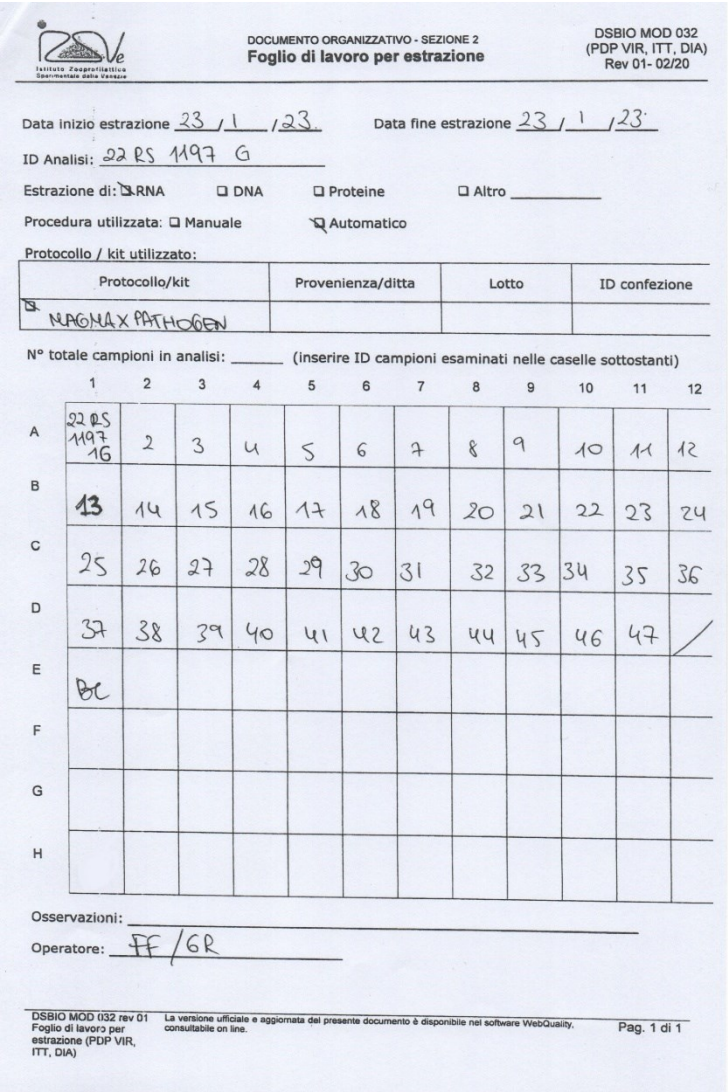
2.2.1 Estrazione dell'RNA

In questa prima fase, i campioni da tamponi rinofaringei e gastroenterici sono stati purificati in modo tale da estrarre l'eventuale RNA virale presente all'interno delle cellule per poterlo successivamente amplificare. Una parte è stata eseguita nel laboratorio sporco, dove sono sempre lavorate le provette con all'interno le matrici al fine di evitare la contaminazione dei reagenti presenti. Parallelamente, nella stanza pulita, sono state preparate le piastre contenenti le soluzioni da inserire poi nell'estrattore automatico KingFisher Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Entrambe le procedure sono state eseguite sotto cappe biologiche, con l'aggiunta di manicotti per la protezione delle braccia nella fase sporca. Il kit per l'estrazione che è stato utilizzato è il MagMAX Pathogen kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Prima di tutto è stata eseguita la preparazione dei campioni tramite la seguente procedura:

1. Con una micropipetta impostata su 500 µL è stato eliminato l'RNA *later* da ogni provetta.
2. Sono stati poi inseriti 500 µL di PBS (*Phosphate Buffered Saline*): soluzione isotonica con effetto tampone per mantenere il pH costante.
3. Una volta completato, tutte le provette sono state vortexate. I campioni da tamponi gastroenterici sono stati anche centrifugati a 10'000 rpm per 2 minuti.

Parallelamente sono state preparate 6 piastre (4 di lavaggio, 1 *Elution*, 1 *Sample plate*) con all'interno i reagenti presenti nel kit necessari per la fase di estrazione. In ogni piastra sono stati riempiti 48 pozzetti in totale, 47 in cui sono stati inseriti successivamente i campioni e uno utilizzato come controllo negativo chiamato "bianco estrazione" ("Be", Figura 3) per accertare non ci fossero contaminazioni dei reagenti.



DOCUMENTO ORGANIZZATIVO - SEZIONE 2
Foglio di lavoro per estrazione

DSBIO MOD 032 (PDP VIR, ITT, DIA) Rev 01- 02/20

Data inizio estrazione 23 / 1 / 23 Data fine estrazione 23 / 1 / 23

ID Analisi: 22 RS 1197 G

Estrazione di: ☒ RNA ☐ DNA ☐ Proteine ☐ Altro _____

Procedura utilizzata: ☐ Manuale ☒ Automatico

Protocollo / kit utilizzato:

Protocollo/kit	Provenienza/ditta	Lotto	ID confezione
☒ MAGMAX PATHOGEN			

N° totale campioni in analisi: _____ (inserire ID campioni esaminati nelle caselle sottostanti)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	22 RS 1197 1G	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	
E	Be											
F												
G												
H												

Osservazioni: _____

Operatore: FF / GR

DSBIO MOD 032 rev 01 Foglio di lavoro per estrazione (PDP VIR, ITT, DIA)

La versione ufficiale e aggiornata del presente documento è disponibile nel software WebQuality, consultabile on line.

Pag. 1 di 1

Figura 3. Foglio di lavoro utilizzato per la fase di estrazione.

Una volta concluse le fasi preliminari, sono stati prelevati 200 µL di ogni campione e, avendo cura di mantenere l'ordine originale, stati inseriti nella *Sample plate* precedentemente preparata. La metodica seguita ha previsto il passaggio del campione nelle diverse piastre che ha permesso la lisi cellulare e la liberazione degli acidi nucleici. Per il loro isolamento sono state utilizzate delle sfere magnetiche: in presenza del campo magnetico, le sfere legate agli acidi nucleici sono state trattenute sul fondo mentre è stato eliminato il surnatante. Interrompendolo, il materiale genetico è stato liberato e inserito nella micropiastra finale. Tutto il processo è avvenuto automaticamente grazie all'utilizzo dell'estrattore automatico presente in struttura. La piastra è stata conservata a temperatura di –80°C fino alla successiva fase.

2.2.2 RT-PCR: Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

Dopo aver ottenuto la micropiastra con gli RNA dei campioni estratti, è stata eseguita la seconda fase della processazione dei campioni, in cui è stata effettuata l'RT-PCR. È stato seguito il protocollo "nested-RT-PCR pan-CoV" sviluppato presso IZSVE da Drzewnioková et al., (2021), il quale è stato suddiviso in due step: nel primo è avvenuta la retrotrascrizione dell'RNA, mentre nel secondo è stato amplificato il filamento appena ottenuto.
Il protocollo si è basato sull'utilizzo di due coppie di primer *pan-coronavirus* in grado di legare la maggior parte dei coronavirus a livello di gene RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) dei mammiferi, in modo da riuscire a identificare non solo i coronavirus endemici ma anche quelli emergenti. La metodica ha avuto dei limiti nella discriminazione di TGEV e PRCV, in quanto essi posseggono un genoma molto simile tra loro, rendendo necessaria la caratterizzazione della proteina spike o il sequenziamento genomico completo per poter arrivare alla definizione della specie.
La prima operazione è stata preparare le mix di reazione del primo e del secondo step, in cui sono stati inseriti i reagenti necessari affinché la successiva amplificazione potesse avvenire. Essi sono raggruppati nella Tabella 4 e nella Tabella 5 con le rispettive quantità da inserire per ogni reazione, con anche il volume totale necessario per completare ogni piastra. Va notato che è stato scelto di preparare la mix per un totale di 53 pozzetti per il primo step e 54 per il secondo: nella micropiastra erano presenti 47 campioni più un "bianco estrazione" (controllo negativo dell'estrazione), a cui è stato aggiunto un "Bmix1" (controllo negativo della prima mix) e due "K+" (controlli positivi), per un totale di 51 reazioni. Ne sono state conteggiate altre due per le eventuali perdite che si sarebbero potute avere durante l'aliquotazione. Per il secondo step è stato predisposto un ulteriore pozzetto in cui aggiungere quello contenente il "Bmix2" (controllo negativo della seconda mix). Tutti i reagenti erano stoccati a –20°C e sono stati

scongelati solamente durante il loro utilizzo, avendo sempre l'accortezza di tenerli a temperatura di refrigerazione. Tutte le operazioni sono state eseguite in un laboratorio utilizzato solo a questo scopo (laboratorio pulito) e sotto una cappa biologica.

Tabella 4. Reagenti necessari per il primo step della RT-PCR con relativa concentrazione e volume finale per singola reazione e per piastra. Dati ottenuti dal protocollo nested-RT-PCR pan-CoV fornito dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e utilizzato per questo studio.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE	µl totali (x53)
Acqua ultrapura sterile	/	7,75	410,75
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (Qiagen Cod 210212/5)	1X	5	265
dNTP Mix 10mM of each	0,4 mM of each	1	53
PRIMER panCoV Hu FW 10µM 5'-AARTTYTAYGGHGGYTGG-3'	1 µM	2,5	132,5
PRIMER panCoV Hu REV 10µM 5'-GARCARAATTCATGAGGDCC-3'	1 µM	2,5	132,5
RNase Inhibitor 40U/µl (Promega cod. n° N2611)	10 U	0,25	13,25
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	/	1	53
VOLUME TOTALE		20	1060
VOLUME CAMPIONE RNA		5	/
VOLUME FINALE DI REAZIONE		25	/

Tabella 5. Reagenti necessari per il secondo step della RT-PCR con relativa concentrazione e volume finale per singola reazione e per piastra. Dati ottenuti dal protocollo nested-RT-PCR pan-CoV fornito dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e utilizzato per questo studio.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE	µl totali (x54)
Acqua ultrapura sterile	/	16,05	866,7
PCR BUFFER 10X	1X	2,5	135
$MgCl_2$ 50mM	2,5	1,25	67,5
dNTPs mix 10mM	0,2 mM	2	108
PRIMER panCoV Chu FW nest 10µM 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'	0,4 µM	1	54
PRIMER panCoV Chu REV nest 10µM 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCAT-3'	0,4 µM	1	54
Platinum Taq 5U/µl (Invitrogen cod. 10966-034)	1U	0,2	10,8
VOLUME TOTALE		24	1296
VOLUME CAMPIONE DNA 1° round		1	/
VOLUME FINALE DI REAZIONE		25	/

Una volta preparate le mix, ogni pozzetto della micropiastra per il primo step è stato aliquotato con 20 µl di soluzione, mentre la mix per il secondo è stata conservata a temperatura di -20°C per essere poi utilizzata al termine della prima procedura.

Successivamente, sempre sotto cappa biologica, in ogni pozzetto della micropiastra contenente la mix del primo step sono stati inseriti 5 µl del campione estratto dalla *Sample Plate* precedentemente preparata, ottenendo così un volume finale di 25 µl per ogni pozzetto. In quelli contrassegnati da "K+" sono stati inseriti due diversi controlli positivi che erano conservati presso la struttura. Come controllo positivo è stato utilizzato un coronavirus aviario (il *Deltacoronavirus* della bronchite infettiva IBV), al fine di identificare eventuali contaminazioni con più facilità.

Dopo aver terminato anche questo passaggio, tutti i pozzetti sono stati chiusi ermeticamente e la piastra è stata inserita nel termociclatore automatico, impostando i cicli come descritto in Tabella 6, seguendo quanto descritto nel protocollo. L'amplificazione del primo step ha avuto una durata totale di circa 2 h e 15 min e ha dato come risultato un amplificato della dimensione di 668 paia di basi.

Tabella 6. Ciclo di amplificazione utilizzato per il primo step RT-PCR. Protocollo nested-RT-PCR pan-CoV. Dimensione amplificato: 668 paia di basi.

RT	Denat. iniziale	Denaturazione	Annealing	Estensione	Elongazione finale	Raffreddamento
50 °C 30 min	95 °C 15 min	94 °C 20 sec	52 °C 40 sec	72 °C 60 sec	72 °C 10 min	4 °C ∞
		35 cicli				

Alla conclusione del ciclo, è stata aliquotata la micropiastra per il secondo step con 24 µl della seconda mix preparata in precedenza. È stato poi prelevato 1 µl per ogni campione di DNA ottenuto al termine del primo step ed è stato inserito nella nuova piastra. Questo processo è stato effettuato fuori dalla cappa, in quanto non era rischioso per l'operatore e la potenziale contaminazione della cappa che si sarebbe potuta generare dalla manipolazione dei campioni sarebbe stata di difficile eliminazione. Sono stati nuovamente chiusi tutti i pozzetti ed è stato avviato un ulteriore ciclo nel termociclatore con la programmazione riportata in Tabella 7. In questo caso il ciclo ha avuto una durata di circa 1 ora e ha permesso di ottenere un amplificato della dimensione di 440 paia di basi.

Tabella 7. Ciclo di amplificazione utilizzato per il del secondo step RT-PCR. Protocollo nested-RT-PCR pan-CoV. Dimensione dell'amplificato: 440 bp.

Denaturazione iniziale	Denaturazione	Annealing	Estensione	Raffreddamento
94 °C 3 min	94 °C 20 sec	50 °C 30 sec	72 °C 50 sec	4 °C ∞
		30 cicli		

2.2.3 Elettroforesi su gel

Dopo aver terminato entrambi gli step dell'RT-PCR, è stata ottenuta una micropiastra nei cui pozzetti era presente l'eventuale materiale genetico amplificato di 440 paia di basi. A questo punto è stato necessario proseguire con l'elettroforesi su gel, che è stata effettuata con una macchina automatica presente in ISZVE. Per farlo sono stati preparati 5 strip da 12 microprovette ognuna (Figura 4), in modo tale da avere spazio per un'intera piastra che conteneva in tutto 52 pozzetti riempiti.

Figura 4. Strip da 12 microprovette utilizzate per la corsa elettroforetica su gel

Sono stati prelevati 10 µl di campione per ogni pozzetto e sono stati inseriti in ogni provetta, avendo cura di mantenere l'ordine originale. L'ultima strip è stata dedicata ai tre controlli negativi e ai due positivi, mentre i pozzetti rimasti vuoti sono stati riempiti con una soluzione *buffer*. Dopo aver concluso la preparazione e aver tarato la macchina con una soluzione neutra, le strip sono state inserite nell'apposito scomparto ed è stato avviato il ciclo, il quale ha avuto una durata di circa 50 minuti.

Al termine del processo, il computer ha elaborato i dati automaticamente e ha generato uno schema a bande in cui si sono potuti osservare i segmenti di DNA presenti (Figura 5). L'RT-PCR ha amplificato un segmento di 440 paia di basi; quindi, un campione veniva considerato positivo quando si evidenziava una banda tra 400 e 500 paia di basi e i controlli negativi e positivi risultavano corretti.

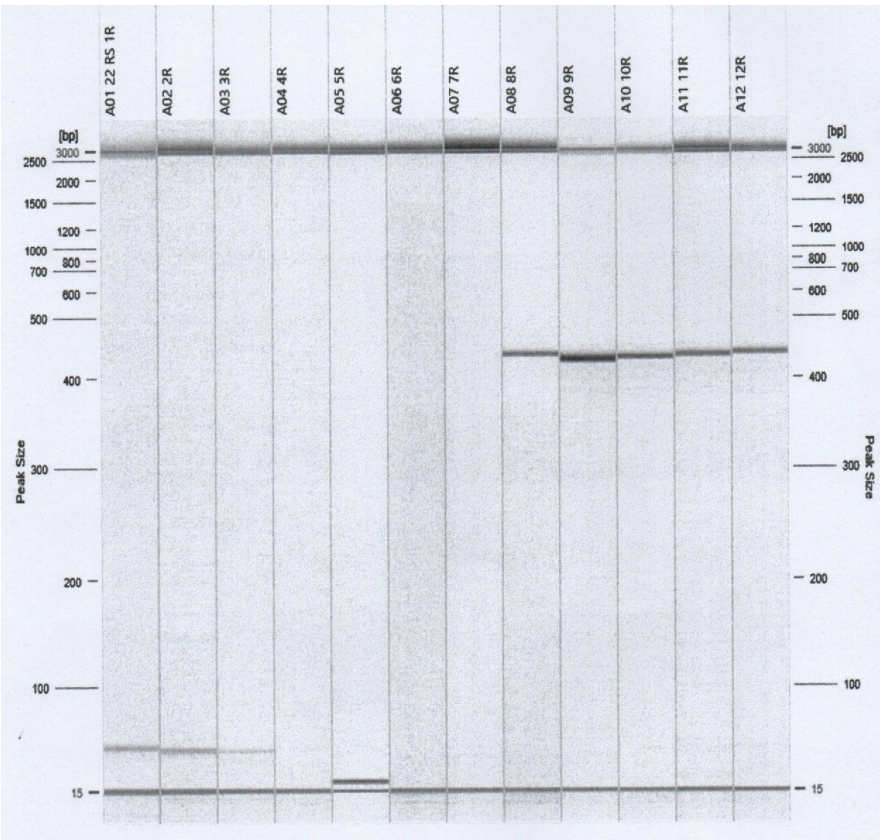


Figura 5. Esempio del risultato parziale di un'elettroforesi su gel preso dal campionamento del 19 luglio 2022. I campioni 8R, 9R, 10R, 11R e 12R sono risultati positivi, mentre gli altri negativi.

2.2.4 Sequenziamento e analisi filogenetica

I campioni risultati positivi alla metodica di nested-RT-PCR pan-CoV sono stati sottoposti a sequenziamento presso il laboratorio dell'ISZVE per determinare le sequenze consenso della zona amplificata, ovvero una porzione dell'RdRp pari a circa 440 paia di basi. A questo scopo sono stati utilizzati i *primers* di amplificazione del secondo step, un approccio di tipo Sanger e il software di sequenziamento SeqScape3. In generale, questa porzione è considerata sufficiente per identificare il campione come appartenente ad una specie conosciuta di CoV, ma non risulta sempre efficace per distinguerne le sottospecie. Ad esempio, i virus suini TGEV e PRCV si differenziano per mutazioni nel gene S, codificante per la proteina di superficie spike.

Le sequenze ottenute in questo studio sono state confrontate con quelle depositate nei *database open access* utilizzando il programma BLAST, disponibile online (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Questa prima analisi ha permesso una classificazione preliminare del campione positivo identificando il virus a maggiore identità. Successivamente è stata effettuata un'analisi filogenetica di tipo *Maximum Likelihood* (ML). A questo scopo, sono state dapprima allineate le sequenze originali con altre sequenze scaricate dal database *open access* Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), incluse le varianti a maggiore

identità individuate tramite analisi BLAST e alcune sequenze di riferimento per i virus in esame. Vista l'elevata distanza genetica tra PHEV (appartenente al genere *Betacoronavirus*) e AlphaCoV1 (appartenente al genere *Alphacoronavirus*) si è optato per effettuare due analisi filogenetiche distinte. Al fine di calibrare correttamente gli alberi sono state inserite come radice 3 sequenze appartenenti ad una specie virale diversa, ossia il virus umano HKU1 per l'albero di PHEV e il coronavirus isolato dal pipistrello *Sturnira lilium* per l'albero di AlphaCov1. L'allineamento è stato effettuato utilizzando il programma *online* Mafft, selezionando le impostazioni "G-INS1" e lasciando gli altri parametri come da *default* (https://mafft.cbrc.jp/alignment/server). L'albero filogenetico ML è stato ottenuto con il programma PyML (versione 3.0) implementato nel programma Seaview (Lyon, France), utilizzando un modello di sostituzione GTR+G4 e un algoritmo per il supporto dei cluster di tipo SH-*like*. Gli alberi ottenuti sono stati modificati graficamente utilizzando il programma iTol (https://itol.embl.de/), per mettere in evidenza i rapporti filogenetici tra i virus identificati nello studio in aziende o campionamenti diversi. In particolare, le sequenze sono state evidenziate utilizzando colori diversi a seconda dell'azienda di campionamento, uguali per i due virus oggetto di analisi, e, nel caso dell'azienda 16 sottoposta ad indagine di tipo longitudinale, indicando simboli diversi a seconda del periodo di prelievo.

2.3 Analisi dei dati

Dopo aver ricavato tutti i dati, si è proceduto con la loro standardizzazione e controllo dei possibili errori di notazione per poter eseguire successivamente l'analisi statistica. Inizialmente erano stati creati un totale di tre file: il primo conteneva i singoli campionamenti effettuati oltre ad alcuni dei metadati aziendali e degli animali; il secondo raggruppava i dati raccolti in ogni giornata indicando solamente il numero totale dei campioni effettuati e delle positività rilevate per le diverse specie virali; infine, il terzo conteneva le risposte alle checklist che gli allevatori avevano fornito durante la fase di campo. Da questi tre differenti database ne è stato creato uno quarto che riunisse tutti i dati significativi ai fini della ricerca, in modo da compattarli e facilitarne lo studio (Allegato 1). Sono state altresì aggiunte delle colonne per facilitare il conteggio dei positivi durante il successivo passaggio.

Per la creazione del database è stato utilizzato il programma Microsoft Excel e, grazie all'utilizzo delle tabelle pivot come strumento di raggruppamento, i dati sono stati sintetizzati in tabelle riassuntive che conteggiassero il numero di positivi e frequenze relative (prevalenze) rispetto ad uno o più livelli dei fattori considerati, tra cui: dimensione aziendale, tipologia di

azienda, possibilità per l'animale di accedere o meno all'esterno, pavimentazione, movimentazioni, procedure di disinfezione dei camion di carico e scarico, accesso di personale esterno ai siti produttivi, tipologia produttiva, localizzazione aziendale e periodo del campionamento.

Dopo aver prodotto la sintesi dei dati tramite l'utilizzo delle tabelle pivot, sono stati eseguiti i test statistici del chi quadrato o di Fisher quando opportuno al fine di testare univariatamente l'associazione di eventuali fattori di rischio e l'infezione da PHEV e AlphaCoV1. Nonostante il numero di aziende sia stato inferiore al target prefissato, riducendo la potenza campionaria, l'analisi dei fattori di rischio è stata anche finalizzata con un approccio multivariabile utilizzando la funzione "glimmix" con l'azienda come fattore random (SAS System 9.4). La costruzione del modello finale ha tenuto conto della autocorrelazione tra predittori (e.g. tipo di pavimentazione e categoria animale), della distribuzione dei livelli dei fattori di rischio per le positività e della necessità di escludere i record appartenenti alle scrofe per assoluta negatività di queste. Inoltre, sono state necessarie alcune aggregazioni di livelli in variabili multicategoriali (dimensioni aziendali "grandi" vs "medie-piccole"). Il modello finale è quello più parsimonioso e riporta esclusivamente i predittori che sono entrati nell'analisi. L'associazione dei predittori con l'outcome di infezione è riportata in termini di odds ratio. La significatività statistica di tutte le analisi è stata fissata per valore di $\alpha=0.05$ con correzione di Bonferroni per confronti multipli.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati che sono presentati in seguito considerano solamente le specie virali che sono state identificate nello studio, mentre quelle per cui non sono state trovate positività non sono state riportate nella sintesi tabellare dei dati. In particolare, delle sei specie di coronavirus tipiche del suino, ne sono state riconosciute solamente due: PHEV e TGEV/PRCV/SECoV. Vista la metodica utilizzata, non è stata possibile la discriminazione tra TGEV, PRCV e SECoV che sarebbe stata attuabile solamente con la caratterizzazione della proteina spike o sequenziamento del gene S. Tuttavia, siccome il loro riconoscimento è sempre stato fatto a partire da tamponi rinofaringei e poiché la presenza di TGEV è andata quasi scomparendo dopo la comparsa della variante respiratoria (Turlewicz-Podbielska & Pomorska-Mól, 2021), è verosimile che fossero tutti campioni positivi a PRCV. In ogni caso, non potendo avere la certezza della specie virale, in questo studio sono stati considerati come un un'unica infezione e sono stati tutti raggruppati con il nome di *Alphacoronavirus* 1 (AlphaCoV1).

Uno degli obiettivi del progetto è stato quello di determinare se i suini fossero dei potenziali serbatoi animali per il SARS-CoV-2. Come si può osservare dalla Tabella 8, 12 allevatori (66,7%) hanno dichiarato di aver avuto in azienda casi di positività tra gli operatori e di non usare le mascherine come protezione durante il lavoro. In un solo caso è stato dichiarato il controllo della temperatura al personale a inizio giornata lavorativa. Sebbene il numero di aziende campionate non sia stato molto esteso, si può comunque supporre che Covid-19 circolasse all'interno degli allevamenti visto che i campionamenti sono stati effettuati durante la pandemia e le misure per limitarne la diffusione non erano sempre seguite. Nonostante ciò, in nessun tampone è stato identificato SARS-CoV-2, così come in nessun esame sierologico eseguito all'Erasmus Medical Center di Rotterdam è stata rilevata alcuna sieropositività. Questo risultato può suggerire che la specie suina non sia un reservoir per il coronavirus umano ed è in accordo con quanto trovato dagli studi di Shi et al. nel 2020 e di Meekins et al. nel 2020 in cui non è stato rilevato nessun positivo ai tamponi e agli esami sierologici dopo inoculazione sperimentale per via intranasale, intratracheale e orale.

Tabella 8. Fattori che possono influenzare la circolazione di Covid-19 con conteggio del numero di aziende che possiedono o meno il fattore di rischio.

Fattori di rischio	si	no
Presenza di operatori positivi	12 (66,7)	6 (33,3)
Utilizzo mascherine in allevamento	6 (33,3)	12 (66,7)
Controllo temperature del personale	1 (5,6)	17 (94,4)

3.1 Caratterizzazione delle aziende campionate

Le aziende campionate sono state un totale di 18, incluse le due utilizzate ai fini dello studio longitudinale (Tabella 9). I campionamenti effettuati in quest'ultime sono stati di 3 e 4 nel corso di un anno solare, ma ai fini dello studio trasversale ne è stato preso in considerazione solo uno ciascuna: per l'azienda 16 è stato considerato quello effettuato a gennaio 2023, mentre per l'azienda 12 a dicembre 2021. La scelta del periodo invernale è stata fatta per avere una distribuzione più omogenea dei campioni nei trimestri e avere di conseguenza una miglior rappresentatività dei campionamenti trasversali per lo studio del periodo di campionamento.

Tabella 9. Classificazione delle 18 aziende oggetto di studio.

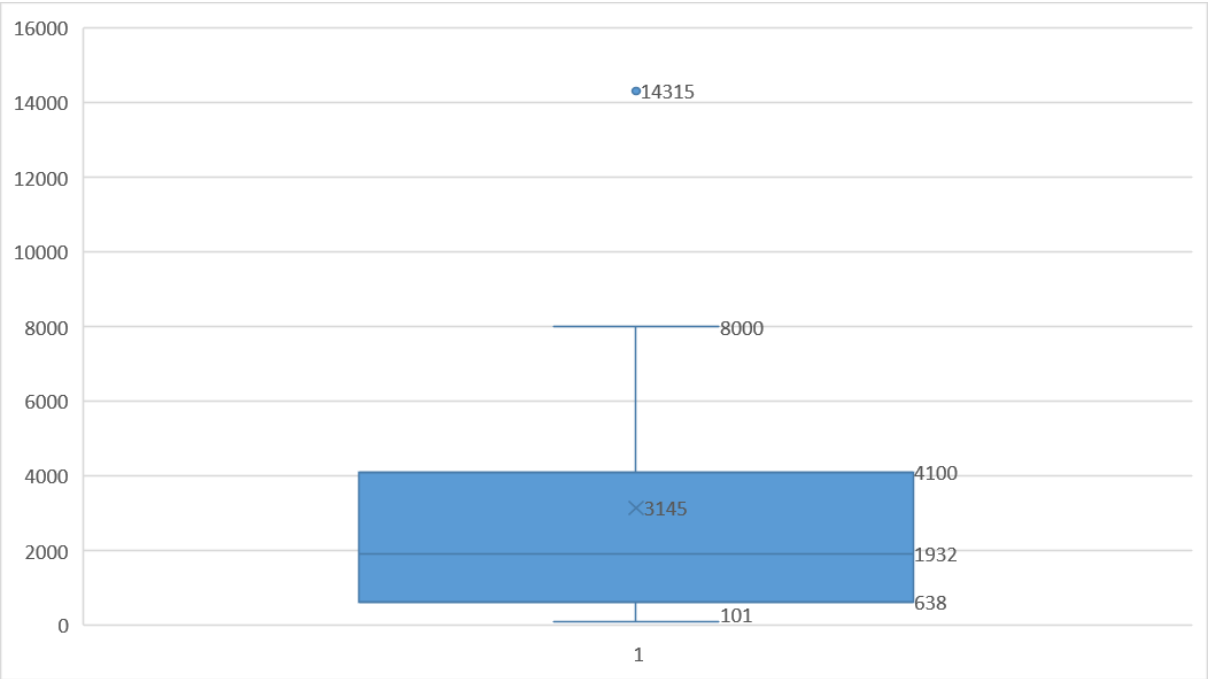
ID AZIENDA	PROVINCIA	TIPO AZIENDALE	SPECIE ALLEVATE	DIMENSIONI
Azienda 1	VR	Riproduzione	Scrofe, Lattoni	300
Azienda 2	VR	Ciclo chiuso	Scrofe, Lattoni, Magroni, Grassi	7940
Azienda 3	PD	Riproduzione	Scrofe, Lattoni	101
Azienda 4	GO	Ingrasso	Lattoni, Magroni, Grassi	150
Azienda 5	TV	Ciclo chiuso	Scrofe, Lattoni, Magroni, Grassi	110
Azienda 6	TV	Ciclo chiuso	Scrofe, Lattoni, Magroni, Grassi	2494
Azienda 7	VR	Riproduzione	Scrofette	750
Azienda 8	VR	Ingrasso	Magroni, Grassi	2500
Azienda 9	VR	Ingrasso	Magroni	3500
Azienda 10	VR	Riproduzione	Scrofe, Lattoni, Magroni	753
Azienda 11	TV	Riproduzione	Scrofe, Lattoni	2160
Azienda 12	GO	Ingrasso	Lattoni, Magroni, Grassi	5000
Azienda 13	VE	Ingrasso	Magroni, Grassi	3800
Azienda 14	VE	Riproduzione	Scrofe, Lattoni	1334
Azienda 15	PD	Riproduzione	Scrofe, Lattoni	14315
Azienda 16	RO	Riproduzione	Scrofe, Lattoni	8000
Azienda 17	GO	Ciclo chiuso	Scrofe, Lattoni, Magroni, Grassi	1700
Azienda 18	TV	Riproduzione	Scrofe, Lattoni	1704

Metà di esse (9) sono allevamenti a ciclo aperto da riproduzione, in cui sono presenti solo scrofe nel reparto riproduzione e lattoni nel reparto svezzamento. Fa eccezione l'Azienda 7 che è un sito di accrescimento di scrofette e ai fini di questo studio tali animali sono stati fatti rientrare nella categoria grassi. 5 allevamenti (27,8%) sono invece centri di ingrasso, dove sono stabulati solo magroni e grassi. Infine, 4 aziende (22,2%) sono a ciclo chiuso che posseggono animali di tutte le età e categorie.

Come si evince dal Grafico 1, metà delle aziende hanno dimensioni medio-piccole con un massimo di 2000 animali allevati. Le grandi aziende sono le più numerose dato che solo loro occupano la mediana superiore ed arrivano fino ad un massimo di 14'315 animali allevati, anche se quest'ultimo dato è un outlier. Il primo e il terzo quartile sono rispettivamente 638 e 4100 animali. Questo dimostra come vi sia la tendenza a passare ad allevamenti sempre di maggiori dimensioni rispetto a quelli medio-piccoli o familiari.

Va notato che la media di 3145 animali per azienda è un dato non in linea con quanto è riferito dall'Anagrafe Zootecnica Nazionale, in cui si calcola una dimensione media di 100 animali nelle aziende di Veneto e Friuli-Venezia Giulia.

Grafico 1. Distribuzione delle dimensioni delle aziende campionate.



In Tabella 10 è riportato in maniera esplicita quanto dichiarato dagli allevatori riguardo le principali misure di biosicurezza attuate in ognuna delle aziende campionate.

Tabella 10. Distribuzione dei fattori aziendali in funzione del rischio.

ID AZIENDA	ACCESSO ESTERNO	INTRODUZIONE ANIMALI DA ALTRE AZIENDE	DISINFEZIONE CAMION IN ENTRATA	ACCESSO AUTISTI IN SITI PRODUTTIVI
Azienda 1	Sì (scrofe)	Sì	No	No
Azienda 2	Sì (Grassi)	Sì	Sì	No
Azienda 3	No	No	Sì	No
Azienda 4	Sì	Sì	Sì	Sì
Azienda 5	All'aperto	Sì	No	Sì
Azienda 6	Sì (lattoni, Grassi)	Sì	Sì	No
Azienda 7	No	Sì	Sì	No
Azienda 8	No	Sì	Sì	No
Azienda 9	Sì (coperto)	Sì	Sì	No
Azienda 10	No	Sì	Sì	No
Azienda 11	Non registrato	No	Sì	No
Azienda 12	No	Sì	Sì	No
Azienda 13	No	No	Sì	No
Azienda 14	No	Sì	Sì	No
Azienda 15	No	Sì	Non sempre	Sì
Azienda 16	No	Sì	Sì	No
Azienda 17	Sì (Grassi)	No	Sì	No
Azienda 18	No	Sì	Sì	No

L'accesso esterno rappresenta un fattore di rischio per il possibile contatto degli animali allevati con la fauna selvatica, che può a sua volta essere un *carrier* per alcuni microrganismi. Per questo motivo la maggior parte delle aziende (10, pari al 55,6%, Tabella 11) non ammette accesso esterno agli animali, mentre 6 sì, ma solo ad alcune categorie. Un solo allevamento tra quelli campionati (Azienda 5) possiede animali stabulati sempre all'aperto.

Solamente 4 allevatori hanno dichiarato di non introdurre animali dall'esterno, informazione che apparentemente potrebbe sembrare anomala per l'Azienda 13 che è registrata come sito di ingrasso. Questo è però possibile in quanto lo stesso proprietario possiede due allevamenti che sono tra loro fisicamente separati (Azienda 13 e 14), ma gli animali stabulati in Azienda 13 provengono tutti dall'Azienda 14 e non sono introdotti da allevamenti terzi. Le aziende 3, 11 e

17 invece sono verosimilmente in grado di gestire il turnover animale internamente essendo aziende da riproduzione (Azienda 3 e Azienda 11) o a ciclo chiuso (Azienda 17). Pertanto, il rischio di introduzione di patogeni tramite l'accasamento di animali da altri allevamenti è diffuso alla maggior parte delle aziende, ma la corretta implementazione di una quarantena efficace può controllarlo.

Infine, solamente 3 aziende (16,7%, Tabella 11) non effettuano di routine la disinfezione dei camion in ingresso. Va sottolineato che non sono stati raccolti i protocolli di lavaggio e disinfezione che potrebbero differire tra loro per efficacia. Per quanto riguarda l'accesso degli autisti nei siti produttivi, solamente 3 allevamenti lo permettono, ma se viene consentito a seguito dell'utilizzo di corretti indumenti monouso come calzari, tute e altri DPI il rischio di ingresso di patogeni può essere comunque controllato.

Tabella 11. Sintesi fattori di rischio aziendali

Fattore di rischio aziendale		Aziende n (%)
Accesso esterno	Sì	7 (38,9)
	No	10 (55,6)
	Non registrato	1 (5,6)
Introduzione animali da altre aziende	Sì	14 (77,8)
	No	4 (22,2)
Disinfezione camion in entrata	Sì	15 (83,3)
	No	3 (16,7)
Accesso autisti in siti produttivi	Sì	3 (16,7)
	No	15 (83,3)

Dai dati raccolti è emerso un quadro rassicurante in materia di biosicurezza, in cui la maggior parte dei detentori degli animali ha dichiarato di attuare le corrette procedure per ridurre il rischio di ingresso di patogeni dell'esterno.

3.2 Valutazione epidemiologica dei fattori di rischio aziendali per l'infezione da PHEV e AlfaCoV1

I fattori di rischio sono stati confrontati con le positività aziendali (un'azienda è stata considerata positiva quando è stato rilevato almeno un caso di positività ad una delle due specie virali) per cercare di determinare se questi fossero effettivamente associabili con la diffusione virale all'interno delle aziende. Sebbene apparentemente vi sia una netta differenza di aziende positive per alcuni livelli di rischio (Tabella 12 e Tabella 13), come l'accesso degli autisti o la

disinfezione dei camion in cui ci sono rapporti che arrivano ad essere di 8:1 tra chi possiede o meno il fattore, questo si verifica sia tra le aziende positive che tra quelle negative, risultando quindi in un evento probabilmente casuale e non dovuto al fattore di rischio in sé, come confermato dall'analisi statistica risultata non significativa.

Nessuno dei fattori di rischio considerati è risultato associato alla positività rilevata a livello aziendale. Va considerato che la limitatezza del campione di aziende analizzate non ha permesso di raggiungere sufficiente potenza per questo tipo di inferenza.

Tabella 12. Positività delle aziende a PHEV in funzione dei fattori di rischio aziendali.

Fattore di rischio aziendale		Aziende positive n (%)	Aziende negative n (%)	Totale	Test statistici *
Accesso esterno	Sì	3 (42,9)	4 (57,1)	7	Fisher = 1 (ns)
	No	5 (50,0)	5 (50,0)	10	
Accesso autisti	Sì	1 (33,3)	2 (66,7)	3	Fisher = 1 (ns)
	No	8 (53,3)	7 (46,7)	15	
Disinfezione camion	Sì	8 (53,3)	7 (46,7)	15	Fisher = 1 (ns)
	No	1 (33,3)	2 (66,7)	3	
Introduzione animali	Sì	8 (57,1)	6 (42,9)	14	Fisher = 0,6 (ns)
	No	1 (25,0)	3 (75,0)	4	

* (ns) = non significativo

Tabella 13. Positività delle aziende ad AlphaCoV1 in funzione dei fattori di rischio aziendali.

Fattore di rischio/ protezione azienda		Aziende positive n (%)	Aziende negative n (%)	Totale	Test statistici *
Accesso esterno	Sì	1 (14,3)	6 (85,7)	7	Fisher = 0,1 (ns)
	No	6 (60,0)	4 (40,0)	10	
Accesso autisti	Sì	1 (33,3)	2 (67,7)	3	Fisher = 1 (ns)
	No	8 (53,3)	7 (46,7)	15	
Disinfezione camion	Sì	8 (53,3)	7 (46,7)	15	Fisher = 1 (ns)
	No	1 (33,3)	2 (66,7)	3	
Introduzione animali	Sì	8 (57,1)	6 (42,9)	14	Fisher = 0,6 (ns)
	No	1 (25,0)	3 (75,0)	4	

* (ns) = non significativo

Vista la non significatività dei dati in funzione della positività aziendale, l'analisi di questi fattori di rischio sarà riproposta commentando i risultati a livello di singolo campione derivanti dallo studio trasversale.

3.3 Analisi della prevalenza di PHEV e AlphaCoV1 nelle aziende campionate

Di seguito saranno riportati i risultati del campionamento trasversale effettuato sulle 18 aziende sopra descritte. In generale, le positività sono poche rispetto ai 942 campioni trasversali eseguiti, con una prevalenza generale che è pari al 2% per AlphaCoV1 e al 6,2% per PHEV (Tabella 14). Sebbene non si conosca la reale prevalenza di PHEV (Turlewicz-Podbielska & Pomorska-Mól, 2021) e per PRCV è stato identificato solamente il suo stato di virus endemico ubiquitario (Vlasova et al., 2020), è comunque possibile ipotizzare che vi sia una solida immunità diffusa tra gli animali allevati che permette loro di mantenere controllata la diffusione delle due specie virali.

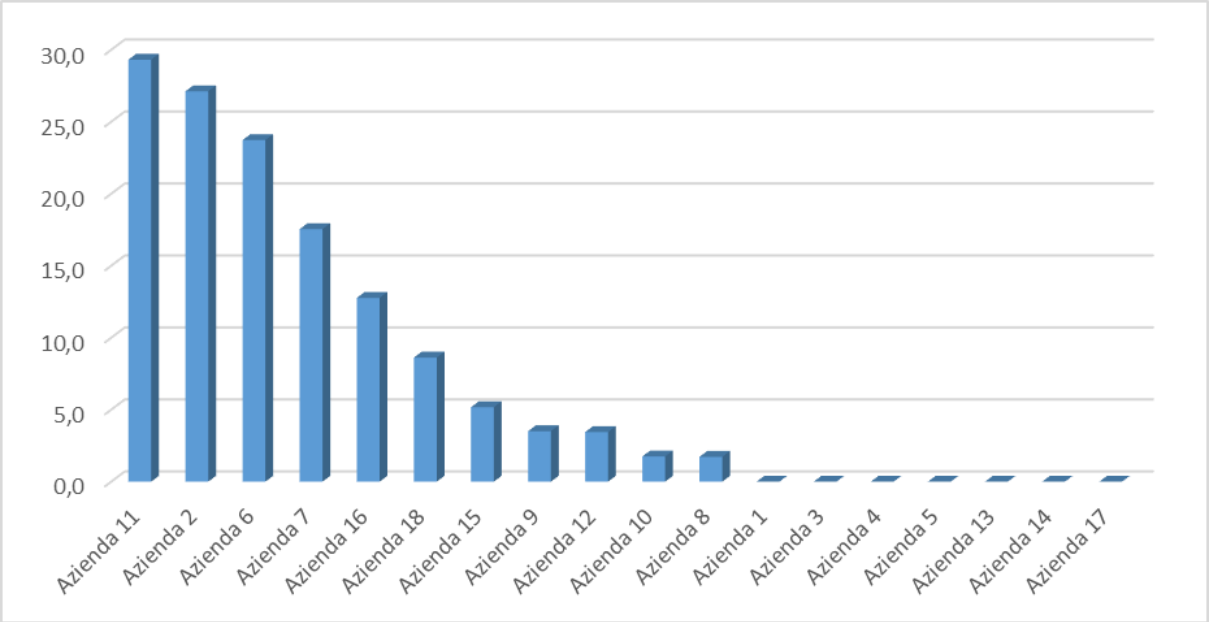
Tabella 14. Riepilogo delle positività rilevate a PHEV e AlphaCoV1 per ogni azienda campionata.

ID Azienda	PHEV n (%)	AlphaCoV1 n (%)	Totale n/N (%)
Azienda 1	0 (0,0)	0 (0,0)	0/50 (0,0)
Azienda 2	10 (16,9)	6 (10,2)	16/59 (27,1)
Azienda 3	0 (0,0)	0 (0,0)	0/58 (0,0)
Azienda 4	0 (0,0)	0 (0,0)	0/45 (0,0)
Azienda 5	0 (0,0)	0 (0,0)	0/46 (0,0)
Azienda 6	13(22,0)	1 (1,7)	14/59 (23,7)
Azienda 7	9 (15,8)	1 (1,8)	10/57 (17,5)
Azienda 8	0 (0,0)	1 (1,7)	1/58 (1,7)
Azienda 9	1 (1,8)	1 (1,8)	2/57 (3,5)
Azienda 10	0 (0,0)	1 (1,8)	1/57 (1,8)
Azienda 11	16 (27,6)	1 (1,7)	17/58 (29,3)
Azienda 12	2 (3,4)	0 (0,0)	2/58 (3,4)
Azienda 13	0 (0,0)	0 (0,0)	0/44 (0,0)
Azienda 14	0 (0,0)	0 (0,0)	0/14 (0,0)
Azienda 15	2 (3,4)	1 (1,7)	3/58 (5,2)
Azienda 16	0 (0,0)	6 (12,8)	6/47 (12,8)
Azienda 17	0 (0,0)	0 (0,0)	0/59 (0,0)
Azienda 18	5 (8,6)	0 (0,0)	5/58 (8,6)
TOTALE	**58 (6,2)**	**19 (2,0)**	**77/942 (8,2)**

Si può osservare che metà degli allevamenti (9 aziende) hanno una prevalenza totale inferiore al 2,6%, di cui 7 (il 78% di quelle inferiori alla mediana e il 39% del totale) sono completamente negative. Il 75% delle aziende ha al massimo il 17,6% di prevalenza, mentre solo il 25% supera questo valore. È quindi evidente che la diffusione virale non è omogenea nel territorio (Grafico

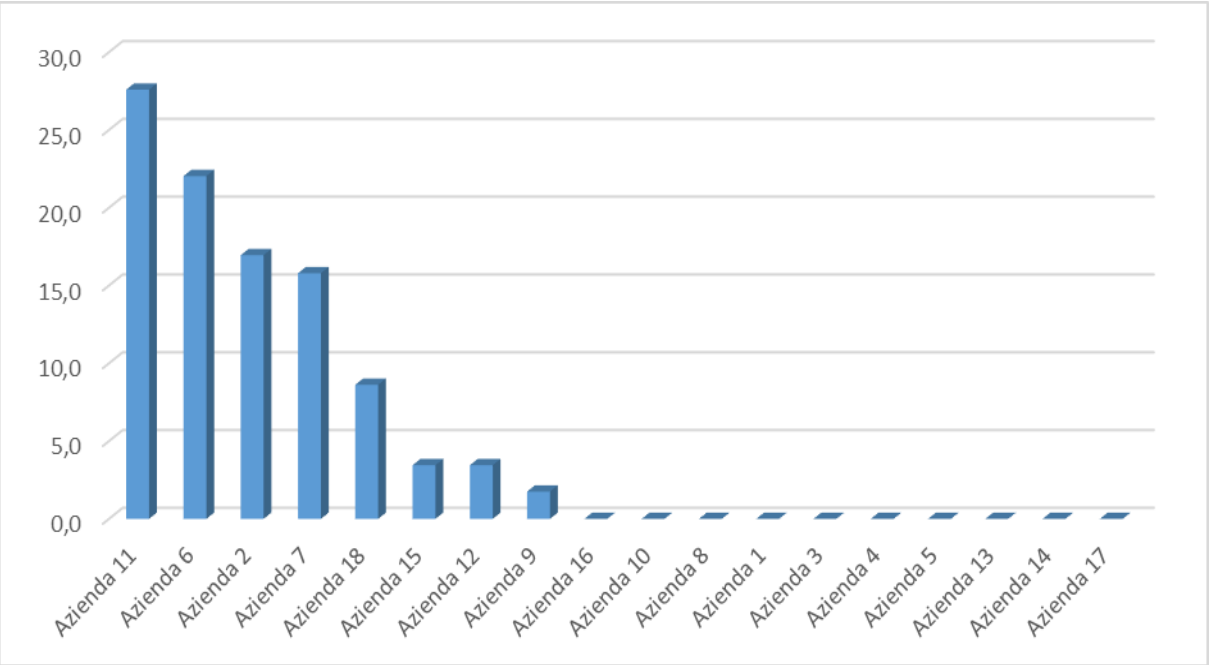
2), ma alcuni allevamenti sono colpiti più di altri, mentre in una grossa percentuale di essi non si rileva alcun caso di positività.

Grafico 2. Prevalenze totali nelle 18 aziende campionate.



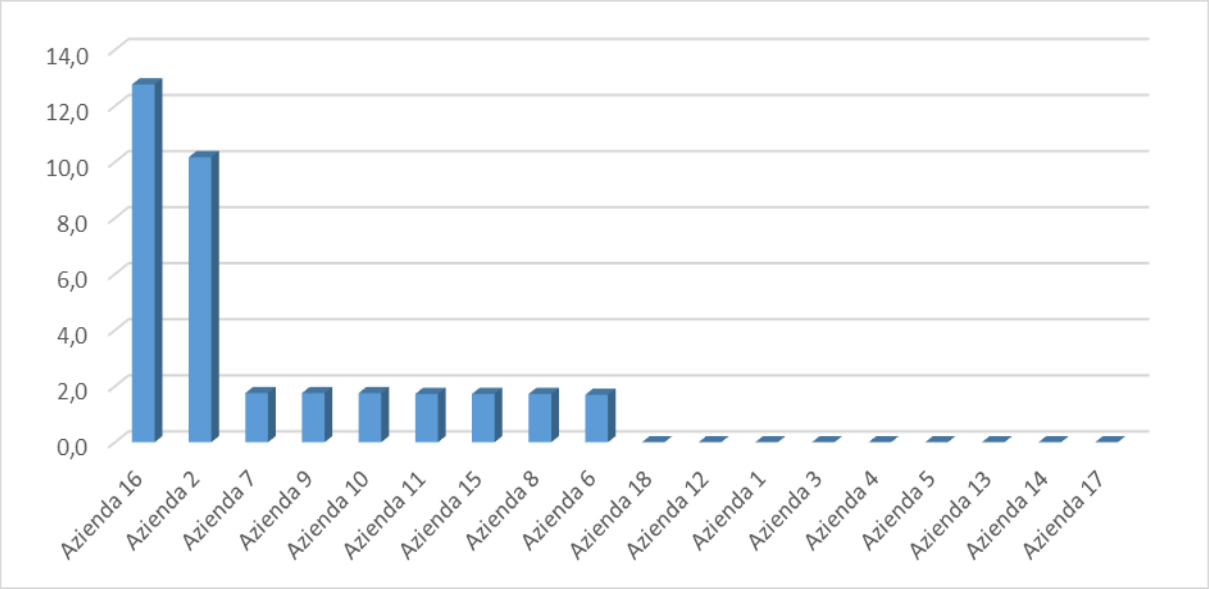
PHEV ha prevalenze nettamente maggiori rispetto ad AlphaCoV1, che raggiungono il picco del 27,6% e ha una distribuzione dei dati più simile a quella generale (Grafico 3). In questo caso in 10 aziende (55,6%) non è stato rilevato alcun positivo.

Grafico 3. Prevalenze di PHEV nelle 18 aziende campionate.



AlphaCoV1 ha delle prevalenze relativamente elevate solamente in 2 aziende in cui raggiunge il 12,8% e il 10,2%, mentre 7 aziende hanno tutte una prevalenza molto bassa compresa tra 1,7% e 1,8%. In 9 aziende (50%) non è stato rilevato alcun positivo (Grafico 4).

Grafico 4. Prevalenze di AlphaCoV1 nelle 18 aziende campionate.



La presenza di un'immunità diffusa nella popolazione suina potrebbe essere il motivo della bassa prevalenza riscontrata. A seguito dell'infezione, i virus permangono nell'organismo per un periodo di tempo limitato non risultando facilmente individuabili alla RT-PCR.

3.4 Analisi delle prevalenze di PHEV e AlphaCoV1 nello studio trasversale

La Tabella 15 raccoglie le positività a PHEV e AlphaCoV1, le quali sono schematizzate in rapporto ad alcuni fattori aziendali strutturali e organizzativi i cui livelli di rappresentatività sono stati analizzati per determinare se vi fosse associazione statistica con le positività riscontrate tramite test del chi quadrato o test esatto di Fisher quando opportuno.

Tabella 15. Positività rilevate alla RT-PCR a PHEV e AlphaCov1 in rapporto ad alcuni fattori aziendali.

FATTORI AZIENDALI		PHEV[a] n (%)	AlphaCoV1[b] n (%)	TOTALE n/N (%)	TEST STATISTICI[*]
Dimensione azienda	Piccola	0 (0,0)	0 (0,0)	0/199 (0,0)	[a] χ^2=19,3; p<0,001
	Media	14 (5,7)	2 (0,8)	16/245 (6,5)	[b] χ^2=10,8; p<0,01
	Grande	44 (8,8)	17 (3,4)	61/498 (12,2)	
Tipo azienda	Ciclo chiuso	23 (10,3)	7 (3,1)	30/223 (13,5)	[a] χ^2=18,6; p<0,0001
	Riproduzione	32 (7,0)	10 (2,2)	42/457 (9,2)	[b] χ^2=3,6; p=0,2 (ns)
	Ingrasso	3 (1,1)	2 (0,8)	5/262 (1,9)	
Pavimentazione	Grigliato/ Fessurato	36 (6,0)	16 (2,7)	52/596 (8,7)	[a] Fisher = 0,01 χ^2=6,7; p<0,01
	Pieno[**]	4 (1,7)	2 (0,9)	6/230 (2,6)	
	Non registrato[****]	18 (15,5)	1 (0,9)	19/116 (16,4)	[a] Fisher = 0,1 (ns)
Accesso esterno	No	33 (5,3)	16 (2,6)	49/624 (7,9)	[a] Fisher = 0,3 (ns)
	Sì	9 (3,5)	2 (0,8)	11/260 (4,2)	[b] Fisher = 0,1 (ns)
	Non registrato[****]	16 (27,6)	1 (1,7)	17/58 (29,3)	
Introduzione animali da altre aziende	Sì	42 (5,8)	18 (2,5)	60/723 (8,3)	[a] Fisher = 0,4 (ns)
	No	16 (7,3)	1 (0,5)	17/219 (7,8)	[b] Fisher = 0,1 (ns)
Disinfezione camion in entrata	Sì	56 (7,1)	18 (2,3)	74/788 (9,4)	[a] Fisher = 0,01
	No[***]	2 (1,3)	1 (0,6)	3/154 (1,9)	[b] Fisher = 0,2 (ns)
Accesso autisti in siti produttivi	Sì	2 (1,3)	1 (0,7)	3/149 (2,0)	[a] χ^2= 7,1; p<0,01
	No	56 (7,1)	18 (2,3)	74/793 (9,3)	[b] χ^2= 1,6; p=0,2 (ns)
TOTALE		**58 (6,2)**	**19 (2,0)**	**77/942 (8,2)**	

[*](ns) = non significativo

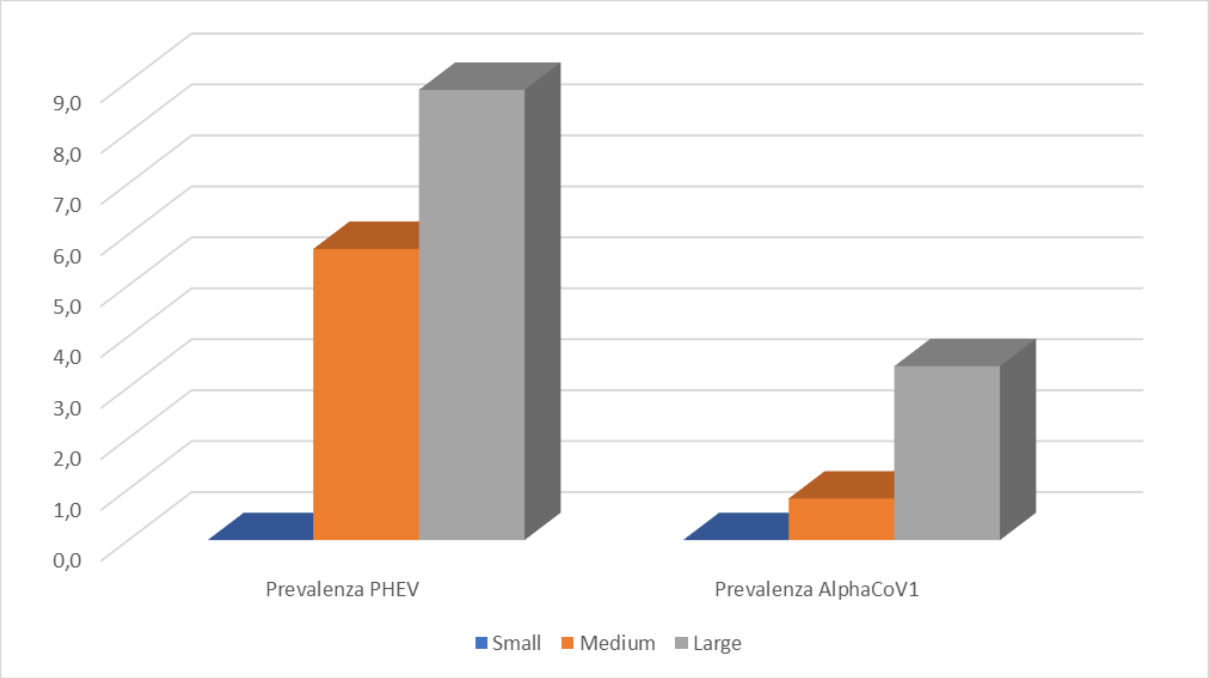
[**]La pavimentazione piena comprende anche un'azienda che alleva suini a terra

[***]Tra le aziende che non effettuano la disinfezione dei camion in entrata ne è stata considerata anche una in cui gli allevatori hanno dichiarato di non eseguirla costantemente

[****]I campioni non registrati per la categorizzazione non sono rientrati nel calcolo dei test statistici

Dimensione azienda. Gli allevamenti sono stati suddivisi sulla base del numero di capi allevati in piccoli (10-500 animali), medi (500-2000) e grandi (>2000). Dalla sintesi dei risultati si può notare che la prevalenza aumenta all'aumentare delle dimensioni delle aziende (Grafico 5). In particolare, negli allevamenti più piccoli non è stato rilevato alcun positivo, mentre in quelli grandi è stata registrata una prevalenza del 8,8% per PHEV e del 3,4% per AlphaCoV1, per un totale del 12,2%. I test statistici hanno dato come risultato un valore significativo, con un *p-value* <0,01 per AlphaCoV1 e <0,001 per PHEV. Il dato va tenuto in considerazione per lo sviluppo che sta avendo la suinicoltura italiana e mondiale, che si sta sempre più indirizzando verso il tipo intensivo con il conseguente aumento delle dimensioni medie degli allevamenti. Questo potrebbe portare ad avere una maggior diffusione dei coronavirus tra gli animali allevati, con il rischio di sviluppo di nuove varianti più virulente soprattutto a seguito di ricombinazioni in caso di coinfezioni (Thakor et al., 2022) e con potenziali danni economici importanti.

Grafico 5. Prevalenze di PHEV e AlphaCoV1 in rapporto alle dimensioni aziendali.



Tipo azienda. Le aziende sono state raggruppate in tre categorie: ciclo chiuso, riproduzione e ingrasso. Si può osservare come vi siano tendenzialmente prevalenze maggiori nelle aziende a ciclo chiuso (10,3% per PHEV e 3,1% per AlphaCoV1), mentre negli allevamenti da riproduzione da ingrasso le positività diminuiscano (Grafico 6). Se per PHEV il dato è risultato significativo con un *p-value* <0,0001, lo stesso non si può dire per AlphaCoV1, in cui il campione non è risultato sufficientemente ampio per raggiungere la significatività statistica (Tabella 15). È difficile identificare una sola causa, mentre è possibile che più fattori concorrano a tale risultato. In primo luogo, in ogni tipologia di allevamento sono stabulate categorie animali diverse e alcune potrebbero essere più suscettibili di altre. Secondariamente, la **pavimentazione** potrebbe influire sulla permanenza e la diffusibilità virale (Grafico 7): si può infatti notare che dove vi sono pavimenti grigliati o fessurati, la prevalenza è nettamente maggiore (6,0% per PHEV e 2,7% per AlphaCoV1) rispetto ai pavimenti pieni (1,7% e 0,9%). Anche in questo caso, la significatività statistica è stata raggiunta solo per PHEV, con un valore del *p-value* <0,01.

Grafico 6. Prevalenze di PHEV e AlphaCoV1 in rapporto alla tipologia aziendale

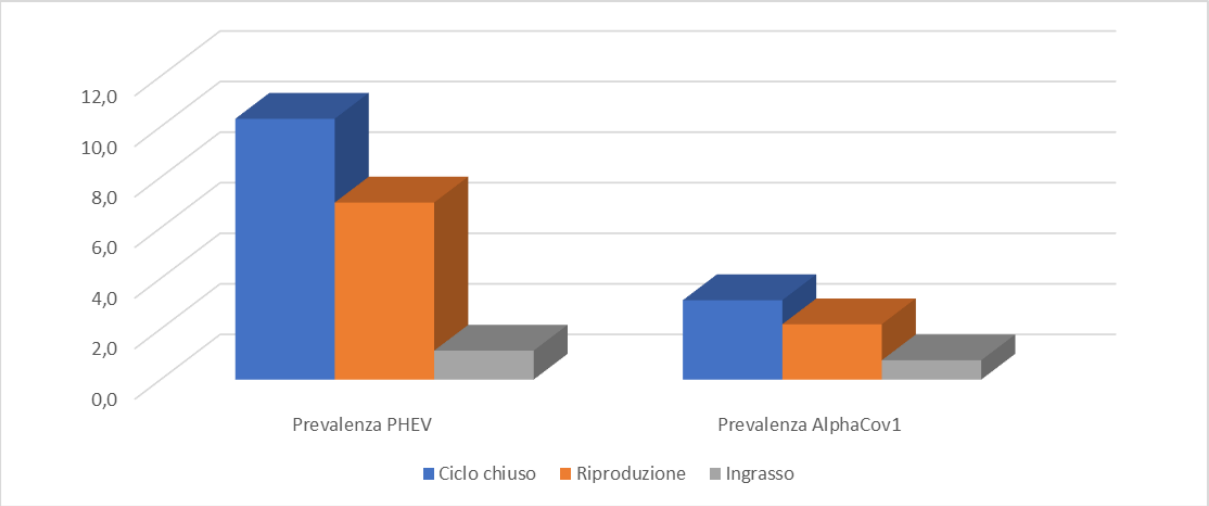
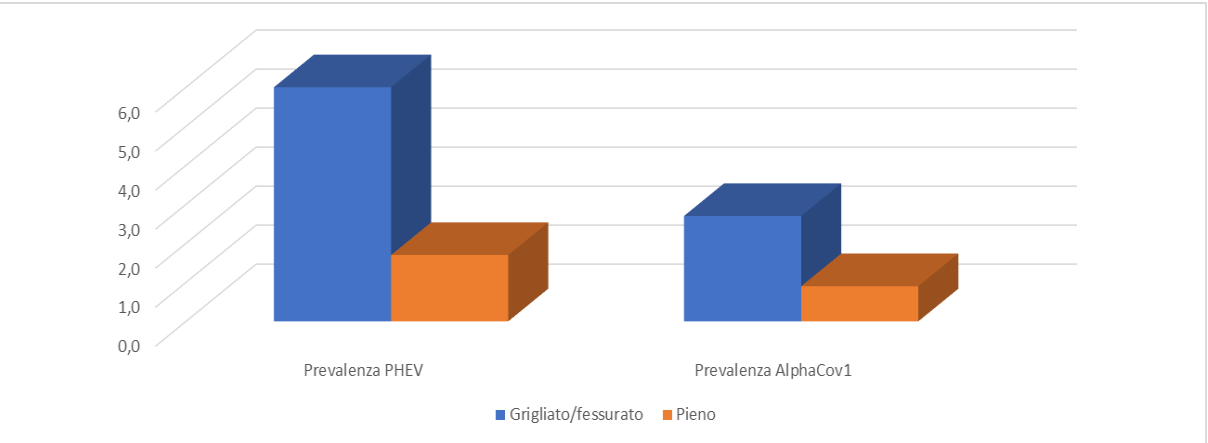


Grafico 7. Prevalenze di PHEV e AlphaCoV1 in rapporto alla pavimentazione



Per quanto riguarda l'**accesso esterno** e l'**introduzione di animali da altre aziende**, i risultati non hanno raggiunto una significatività statistica accettabile; perciò, le valutazioni fatte precedentemente riguardo le positività aziendali possono essere ritenute valide anche qui: con i dati a disposizione, questi elementi da soli non sono associabili ad una maggiore o minore prevalenza.

Un risultato diverso è stato invece ottenuto per il livello "**disinfezione camion**" e "**accesso autisti ai siti produttivi**": qui i test statistici hanno dato una possibile associazione tra prevalenza di PHEV e questi due fattori. Andando ad osservare i risultati sembrerebbe però che vi sia un'inversione di quello che ci si aspetterebbe: aziende che effettuano di routine la disinfezione dei camion e che non permettono l'accesso agli autisti all'interno dell'allevamento hanno una maggior diffusione di PHEV, con una prevalenza del 7,1%. Risulta quindi difficile ritenere che questi siano realmente dei fattori che da soli possano influenzare la prevalenza, mentre è più verosimile che vi sia una causa multifattoriale.

Un fattore con maggiore impatto sulla prevalenza sembra essere la **tipologia produttiva** degli animali, i cui risultati sono riportati in Tabella 16.

Tabella 16. Positività rilevate alla RT-PCR a PHEV e AlphaCov1 in rapporto alla tipologia produttiva.

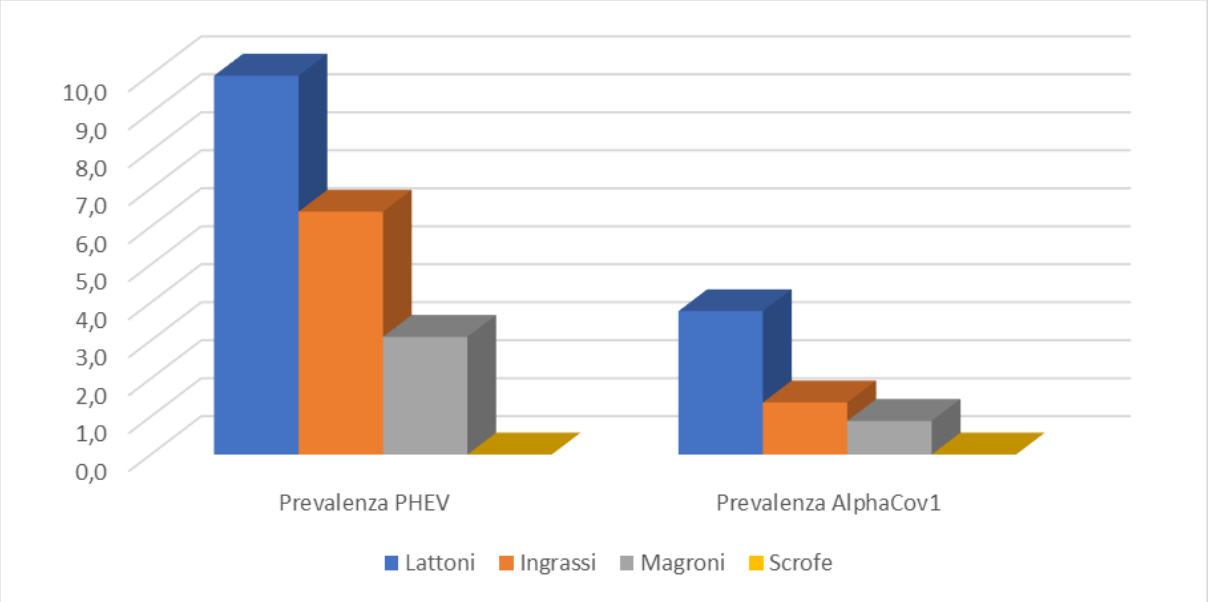
FATTORI RELATIVI AGLI ANIMALI		PHEV[a] n (%)	AlphaCoV1[b] n (%)	TOTALE n/N (%)	TEST STATISTICI
Tipologia produttiva	Scrofe	0 (0,0)	0 (0,0)	0/126 (0,0)	
	Lattoni	37 (10,0)	14 (3,8)	51/371 (13,7)	[a] χ^2=21,3; p<0,0001
	Magroni	7 (3,1)	2 (0,9)	9/226 (4,0)	[b] χ^2= 10,3; p<0,05 (0,016)
	Grassi	14 (6,4)	3 (1,4)	17/219 (7,8)	
TOTALE		**58 (6,2)**	**19 (2,0)**	**77/942 (8,2)**	

La differenza di età (categoria produttiva) appare come un elemento determinante per la diffusibilità di entrambe le specie virali rilevate. Infatti, sono state osservate nette variazioni di prevalenza nei suini di varie età e categoria (Tabella 16):

- PHEV: la prevalenza massima (10,0%) è stata trovata nei lattoni, mentre i magroni sono stati quelli meno colpiti (3,1%) dopo le scrofe che sono risultate tutte negative (Grafico 8). Nei grassi è stata rilevata invece una prevalenza intermedia (6,4%). Questi dati hanno una buona significatività statistica, con un *p-value* <0,0001.

- AlphaCoV1: l'andamento è simile a quanto osservato per PHEV (Grafico 8), con i lattoni come categoria più colpita (3,8%), seguita da grassi (1,4%), magroni (0,9%) e scrofe che anche in questo caso sono risultate totalmente negative. Il *p-value* è <0,05, dimostrando anche in questo caso la significatività del dato.

Grafico 8. Prevalenze di PHEV e AlphaCoV1 in rapporto alla categoria animale.



La suddivisione in base alla categoria animale racchiude al suo interno diversi fattori che tutti assieme concorrono a determinare la diversa suscettibilità: la stabulazione in postazioni singole per le scrofe le rende meno predisposte a diffondere i patogeni rispetto alla stabulazione in gruppi; la pavimentazione è diversa per le scrofe (piena), lattoni (grigliato), grassi (fessurato) e quindi va determinato se questi due fattori possano influenzarsi; lo spazio per capo diminuisce man mano che gli animali crescono, aumentando il contatto diretto e quindi la potenziale trasmissione intraspecifica; il passaggio al reparto di svezzamento dei lattonzoli è un momento di forte stress, che abbassa le difese immunitarie in concomitanza con la fine dell'immunità materna.

Sebbene vari studi abbiano segnalato come i suinetti fino alle due settimane di età siano in generale la categoria più a rischio e che manifesta prima i sintomi (Sun Rui-Qin et al., 2012; Vlasova et al., 2020), l'altro momento più critico rimane la fase di lattone in cui viene persa l'immunità materna e vengono mescolati i gruppi (Saif et al., 2019).

3.5 Output modello multivariabile

Nelle due tabelle seguenti (Tabella 17 e Tabella 18) sono sintetizzati i dati ottenuti dal modello multivariabile effettuato al fine di confrontare le associazioni tra i positivi a PHEV e AlphaCoV1 e i predittori risultati significativi, considerando l'azienda come effetto random.

Tabella 17. Output del modello multivariabile (Proc GLIMMIX) con dentro i predittori risultati significativi per l'infezione da PHEV; l'ID-Azienda è stato considerato come effetto random.

Fattore	Livello	OR	Errore standard	P*
Dimensione azienda	Grandi vs Medie + Piccole	1,26	0,34	0,023
Tipologia produttiva	Lattoni vs Magroni	1,03	0.47	0,029
	Lattoni vs Grassi	0,06	0,37	0,0868

*correzione di Bonferroni per confronti multipli

La dimensione aziendale è risultata significativamente associata ad un maggior rischio di infezione da PHEV di circa il 30% in più per le Aziende classificate come grandi (>2000 animali) rispetto alla categoria medie+piccole.

La categoria animale è anch'essa risultata significativamente associata all'infezione da PHEV, sebbene la differenza sia molto contenuta con un aumento del rischio di infezione di ca. il 3% nei lattoni rispetto ai magroni (svezzati vs accrescimento).

Tabella 18. Output del modello multivariabile (Proc GLIMMIX) con dentro i predittori risultati significativi per l'infezione da AlphaCoV1; l'ID-Azienda è stato considerato come effetto random.

Fattore	Livello	OR	Errore standard	P*
Dimensione azienda	Grandi vs Medie + Piccole	2,39	0,83	0,004
Tipologia produttiva	Lattoni vs Magroni	2,11	0,87	0,015
	Lattoni vs Grassi	1,26	0,74	0,090

*correzione di Bonferroni per confronti multipli

La dimensione aziendale è risultata significativamente associata ad un maggior rischio di infezione da AlfaCoV1 di quasi 2,4 volte maggiore per le Aziende classificate come grandi (>2000 animali) rispetto alla categoria medie+piccole.

La categoria animale è anch'essa risultata significativamente associata all'infezione da AlfaCoV1, con un aumento del rischio di infezione di più del doppio (OR=2,11) nei lattoni rispetto ai magroni (svezzati vs accrescimento).

In entrambe le infezioni rilevate si sono riscontrati gli stessi fattori di rischio associati sebbene con una diversità di forza di associazione. L'infezione da AlphaCoV1 risulta più fortemente condizionata dalla dimensione aziendale e dalla categoria animale degli svezzati. L'andamento dell'infezione a livello di scrofaia e il modello di trasmissione dell'infezione possono essere alla base di questo effetto.

3.6 Analisi dell'effetto stagione per le infezioni da PHEV e AlphaCoV1

Per quanto riguarda l'andamento delle infezioni durante il corso dell'anno è stato effettuato un raggruppamento utilizzando sia tutti i campionamenti trasversali (Tabella 19), sia solamente quelli longitudinali che erano stati prelevati proprio a questo fine (Tabella 20).

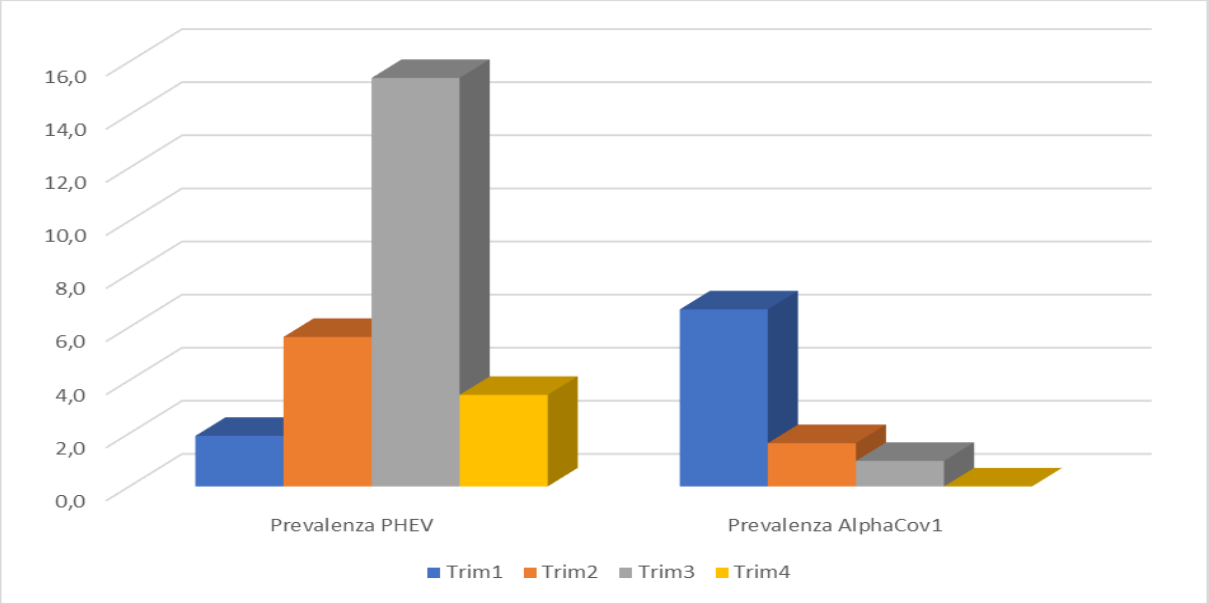
Tabella 19. Positività rilevate alla PCR divise per specie virale in rapporto al periodo di campionamento. Qui sono stati considerati tutti i campioni dello studio trasversale.

FATTORI STAGIONALI		PHEV[a] n (%)	AlphaCoV1[b] n (%)	TOTALE n/N (%)	TEST STATISTICI
Periodo del campionamento	1° trimestre	2 (1,9)	7 (6,7)	9/105 (8,6)	[a] χ^2= 19,7; p<0,001
	2° trimestre	38 (5,6)	11 (1,6)	49/675 (7,3)	[b] χ^2= 13,8; p<0,01
	3° trimestre	16 (15,4)	1 (1,0)	17/104 (16,3)	Caldo (2-3) vs Freddo (1-4): [a] χ^2= 4,7; p<0,05
	4° trimestre	2 (3,4)	0 (0)	2/58 (3,4)	[b] χ^2= 5,2; p<0,05
TOTALE		**58 (6,2)**	**19 (2,0)**	**77/942 (8,2)**	

Dai risultati ottenuti dal campionamento trasversale si nota che, mentre per PHEV il picco di infezioni si ha durante il periodo caldo al terzo trimestre (luglio-settembre, con una prevalenza del 15,4%), per AlphaCoV1 il picco si palesa durante il periodo freddo al primo trimestre dell'anno (gennaio-marzo, con una prevalenza del 6,7%). Sembrerebbe quindi che vi sia una stagionalità tendenzialmente opposta tra i due agenti virali (Grafico 9), a differenza di quanto affermato da altri autori che definiscono i coronavirus come virus stagionali con maggior incidenza durante l'inverno (Saif et al., 2019; Thakor et al., 2022; Vlasova et al., 2020).
I test statistici sono risultati in valori che danno robustezza al dato, sia tenendo separati tutti i trimestri, sia raggruppandoli in periodo caldo (2°-3° trimestre) e periodo freddo (1°-4° trimestre). Va parimenti considerato che il numero di campioni ripartiti tra trimestri non è omogeneo e non è stato eseguito un campionamento così esteso per numero di aziende

coinvolte, tanto che nel quarto trimestre è stata campionata una sola azienda e quindi il fattore stagione potrebbe essere stato influenzato.

Grafico 9. Prevalenze registrate durante l'anno in tutte le aziende studiate trasversalmente.



Nella successiva analisi effettuata sui campioni raccolti longitudinalmente dalle due aziende selezionate (Tabella 20), risulta molto difficile la valutazione statistica che vada oltre la semplice osservazione delle prevalenze riscontrate per trimestre:

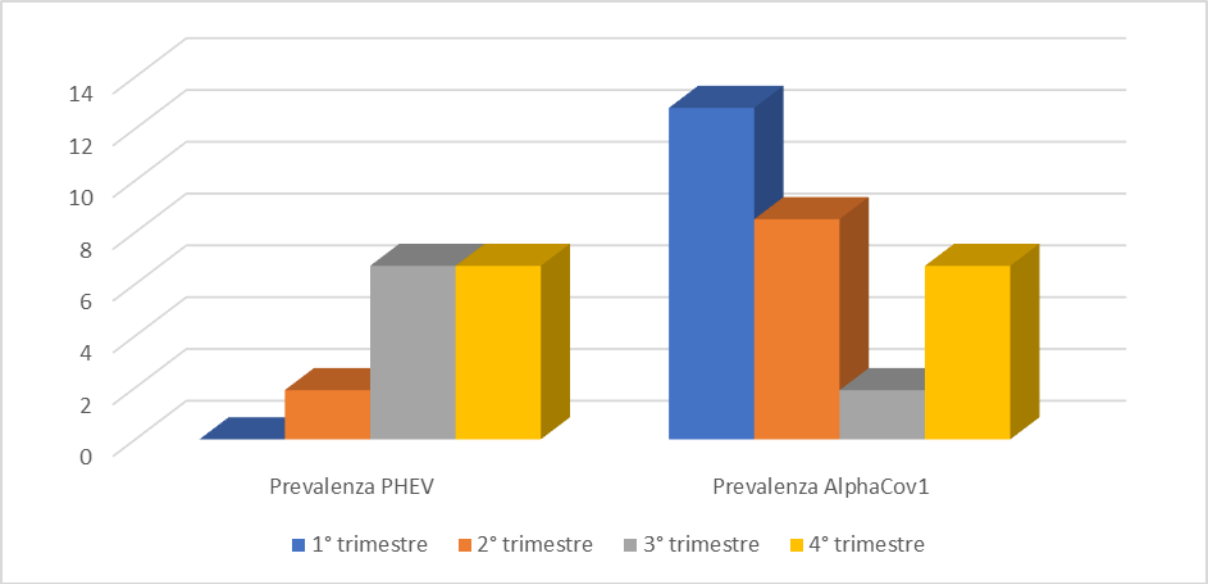
- per PHEV si hanno differenze marcate per frequenza relativa con prevalenze che vanno da 0% a 6,7%. Sono però basate su pochissimi conteggi di positivi, fattore che impedisce il confronto dal punto di vista statistico;
- per AlphaCoV1 i conteggi di positivi sono maggiori e distribuiti meglio nei trimestri (Grafico 10), con prevalenze che vanno da un minimo di 1,9% ad un massimo di 12,8%. Il confronto statistico è più robusto, ma non raggiunge la significatività statistica, rimanendo solamente a livello di tendenza.

Tabella 20. Positività rilevate alla PCR divise per specie virale in rapporto al periodo di campionamento delle due aziende campionate longitudinalmente. NA = not available

PERIODO CAMPIONAMENTO	PHEV[a] n (%)	AlphaCoV1[c] n (%)	TOTALE n/N (%)	TEST STATISTICI
1° trimestre	0 (0,0)	6 (12,8)	6/47 (12,8)	[a] NA
2° trimestre	2 (1,9)	9 (8,5)	11/106 (10,4)	
3° trimestre	7 (6,7)	2 (1,9)	9/104 (8,7)	[b] χ^2= 7,17; p=0,06 (ns)*
4° trimestre	7 (6,7)	7 (6,7)	14/105 (13.3)	
TOTALE	**16 (4,4)**	**24 (6,6)**	**40/362 (11,0)**	

*(ns) = non significativo

Grafico 10. Prevalenze registrate durante l'anno nelle due aziende studiate longitudinalmente.



Si può quindi affermare che il fattore stagionalità può influire sulla diffusibilità virale, ma si rende necessario uno studio più approfondito e con un campione di aziende più ampio per determinare il reale andamento di PRCV e AlphaCoV1 durante il corso dell'anno.

3.7 Considerazioni aggiuntive

3.7.1 Relazione tra segni clinici e positività

Durante la raccolta campioni sono stati registrati anche gli eventuali segni clinici manifestati dagli animali campionati. L'identificazione del segno clinico è stata però difficoltosa, soprattutto per i sintomi respiratori per i quali era difficile determinare se l'animale presentasse o meno tosse o starnuti.

Va rilevato però che gli allevatori non hanno mai riferito nessun aumento dell'insorgenza di determinate patologie, se non nel caso in cui stessero circolando altri patogeni come PRRSV. Questo dato, unito alle basse positività che sono state rilevate, potrebbe indicare che le specie virali che sono state identificate non rappresentino un problema sanitario rilevante per il settore suinicolo italiano.

Anche se in Italia non sono presenti studi epidemiologici specifici riguardo le due specie virali, si può affermare che queste siano in una fase endemica, in accordo con quanto affermato da alcuni autori che sostengono una loro diffusione ubiquitaria con la comparsa di sporadiche epidemie negli ultimi anni (Saif et al., 2019; Thakor et al., 2022; Vlasova et al., 2020). Anche nel report di Leopardi et al. del 2020 sono state trovate delle positività a PHEV e PEDV in

gruppi di animali che non manifestavano alcuna sintomatologia, rafforzando la teoria della loro categorizzazione come virus endemici.

3.7.2 Tamponi (rinofaringeo e rettale) come matrice per la diagnosi diretta

Tutti i campionamenti sono stati effettuati tramite l'utilizzo di due tipologie di tampone: rettale e rinofaringeo. Tale scelta è stata fatta perché esistono coronavirus con eliminazione prevalentemente tramite aerosol (PRCV e PHEV) o tramite feci (TGEV, PEDV, PHEV, PDCoV, SADS-CoV).

Nella Tabella 21 è riassunto il numero di tamponi identificati come positivi per ogni specie virale rilevata in questo studio.

Tabella 21. Positività ai tamponi rettali e rinofaringei.

			TAMPONI RETTALI n (%)			
			PHEV		AlphaCoV1	
			Pos	Neg	Pos	Neg
TAMPONI RINOFARINGEI n (%)	PHEV	Pos	1 (0,1)	50 (5,3)		
		Neg	7 (0,7)	884 (93,8)		
	AlphaCoV1	Pos			0 (0,0)	19 (2,0)
		Neg			0 (0,0)	923 (98,0)

È interessante notare come tra i tamponi rinofaringei siano state individuate molte più positività rispetto a quelli rettali: tra i campioni positivi a AlphaCoV1, nessuno è stato rilevato a partire dal tampone rettale. Questo suggerisce che sia più probabile che le positività riscontrate siano attribuibili al virus respiratorio. Tra i tamponi risultati positivi a PHEV, solamente 8 sono stati rilevati positivi da quello rettale, tra cui uno positivo anche da quello rinofaringeo.

Questo potrebbe essere influenzato da vari fattori: la manualità a livello rettale è più difficoltosa rispetto a quella che viene effettuata a livello nasale, in quanto non sempre si è in grado di arrivare in profondità in modo da avere un campionamento efficace; l'eliminazione virale potrebbe essere intermittente; la sensibilità della matrice fecale potrebbe essere inferiore rispetto a quella rinofaringea; la fase di estrazione in laboratorio è in generale più difficoltosa per i campioni fecali.

Per questi motivi il tampone rinofaringeo è preferibile avendo una miglior sensibilità ed essendo più semplice da processare in laboratorio.

3.8 Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica ha valutato il grado di variabilità genetica dei virus che sono stati sequenziati dai campioni positivi. È emerso che per entrambi i virus la variabilità a livello del gene RdRp è scarsa, indicando la forte somiglianza che c'è tra i ceppi circolanti. In entrambi i casi, le sequenze italiane formano un gruppo separato da quanto descritto in letteratura. Sebbene l'RdRp sia una porzione genomica conservata nei coronavirus che risulta essere molto utile ai fini diagnostici, questa è insufficiente per valutare nel dettaglio l'evoluzione dei coronavirus. In aggiunta, la scarsità di sequenze relative a questi due virus rende difficoltosa un'analisi filogenetica accurata, impedendo il confronto con quelli circolanti nelle zone oggetto di studio e negli anni passati. L'unica eccezione è data dalla presenza di informazioni relative a virus PHEV sequenziati da IZSVE tra il 2018-2020 (Leopardi et al., 2021), che mostrano un maggior grado di correlazione con i virus oggetto di questa tesi. Si nota l'associazione tra i virus sequenziati nell'Azienda 6 e un virus rinvenuto nel 2018 nella stessa.

Le sequenze di PHEV possono però essere raggruppate sulla base dell'azienda di provenienza (Figura 6): in ogni allevamento circola una sola variante, che cambia spostandosi da un'area ad un'altra. La clusterizzazione di PHEV per azienda, unita all'assenza di variabilità di virus identificati in una stessa azienda in periodi diversi suggerisce un andamento endemico dell'infezione, con permanenza del virus nel contesto aziendale e reinfezione ad ogni ciclo produttivo piuttosto che l'introduzione ripetuta di ceppi diversi con l'arrivo di animali nuovi dall'esterno. Questo dato è confermato dall'alta similitudine di virus sequenziati da una stessa realtà (Azienda 6) anche a distanza di 4 anni.

Stesso discorso non può essere fatto per AlphaCoV1, per il quale è sempre stato isolato lo stesso ceppo virale, che suggerisce la circolazione di un'unica sottospecie di coronavirus tra PRCV, TGEV, SECoV (Figura 7). L'assenza di una sua clusterizzazione potrebbe indicare una più facile circolazione del virus tra azienda e azienda. Tuttavia, sono necessari ulteriori dati genetici per investigare ulteriormente questo dato, studiando in particolare le variazioni a livello di segmenti ipervariabili quali il gene S, codificante per la proteina spike di superficie. Questa analisi permetterebbe innanzitutto di caratterizzare il virus circolante in termini di sottospecie virale (PRCV, TGEV, SECoV) e di investigarne l'evoluzione.

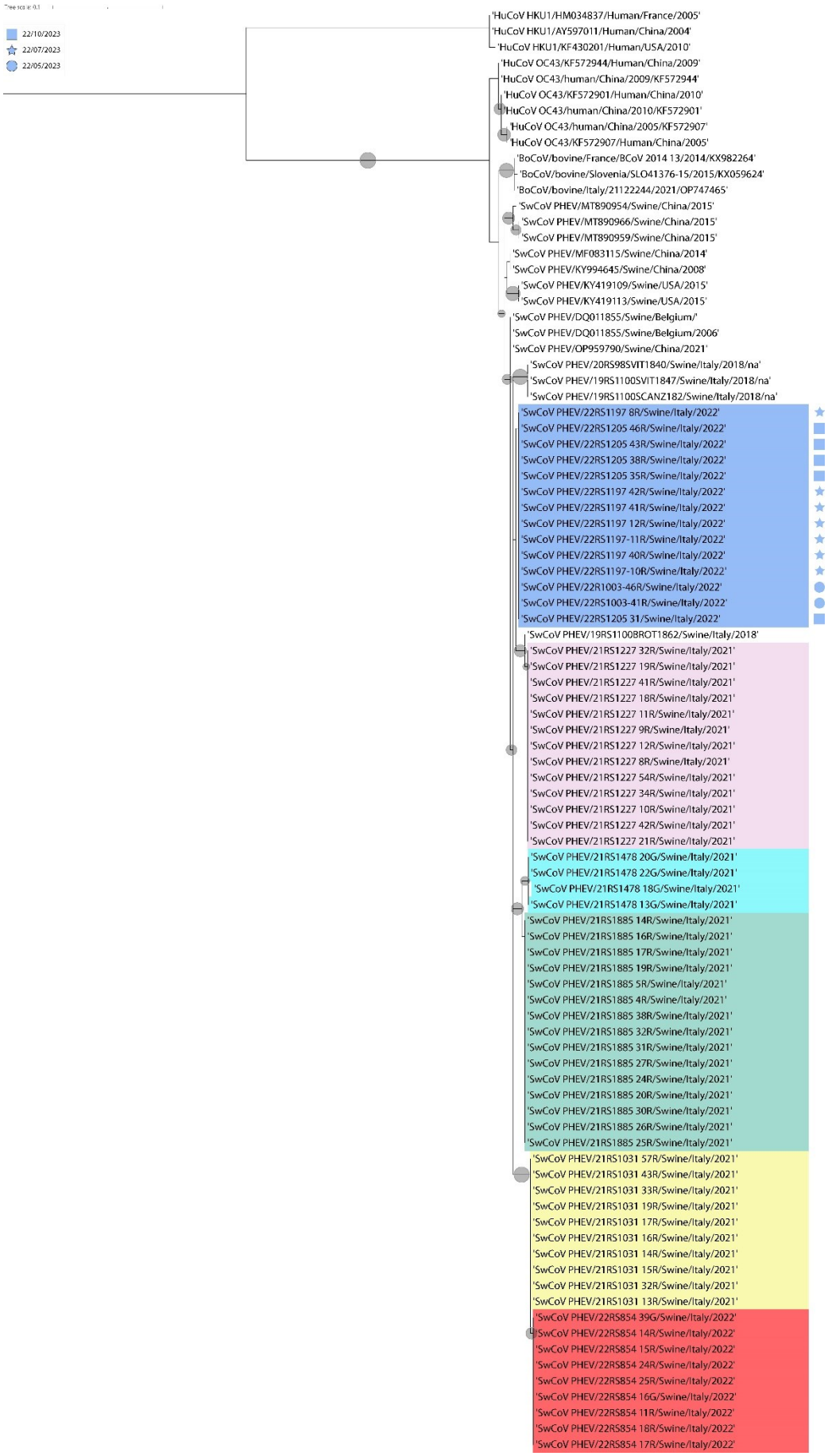


Figura 6. Albero filogenetico di PHEV basato sul sequenziamento di RdRp. Colori diversi indicano la provenienza della sequenza da aziende diverse, i simboli indicano i diversi campionamenti eseguiti nella medesima azienda

Figura 7. Albero filogenetico di AlphaCoV1 basato sul sequenziamento di RdRp. Colori diversi indicano la provenienza della sequenza da aziende diverse; i simboli indicano i diversi campionamenti eseguiti nella medesima azienda.

4. CONCLUSIONI

Sebbene siano stati rilevati alcuni limiti dello studio dovuti principalmente alle dimensioni campionarie, i risultati rappresentano comunque una sostanziale valutazione dello status epidemiologico riguardo i coronavirus suini nel nord-est Italia, rilevando la circolazione di PHEV e AlfaCoV1.

Nessuno dei campioni analizzati è risultato positivo a SARS-CoV-2 né alla diagnosi diretta (RT-PCR), né a quella indiretta (sierologia), suggerendo che la specie suina, se anche fosse suscettibile al coronavirus umano, non abbia un ruolo epidemiologico sulla sua diffusione.

Nonostante le misure di biosicurezza attuate dalle aziende siano in generale di buon livello, sarebbe necessario un campione più ampio per ottenere dei risultati più robusti e poter valutare la loro efficacia nel prevenire l'ingresso dei coronavirus o per limitarne la diffusione verso altre aziende.

I fattori aziendali quali numero di animali allevati e pavimentazione sono risultati essere significativi: le aziende più grandi hanno anche un numero maggiore di casi, mentre in quelle più piccole non è stato rilevato nessun positivo; gli animali stabulati in pavimentazione piena sembrano essere meno esposti al contagio rispetto a quelli allevati in pavimenti grigliati o fessurati. Questo dato va però rapportato con la categoria animale, che si è dimostrata anch'essa significativa. Durante lo stadio di lattone è stato registrato il picco di contagi, mentre nelle scrofe non è stato rilevato nessun tampone positivo. Gli animali di diverse età sono stabulati in diverse pavimentazioni (scrofe in pavimentazione piena, lattoni in grigliato, grassi in fessurato), quindi sono necessari ulteriori studi per determinare quale sia il fattore che influenza maggiormente la diffusibilità virale.

Tramite lo studio del modello multivariabile, considerando l'azienda come effetto random, è stata confermata l'associazione sia tra le prevalenze riscontrate e le dimensioni aziendali, che tra le prevalenze e la tipologia produttiva. Entrambi i predittori sono stati significativamente associati ad un maggior rischio di infezione per PHEV e AlphaCoV1.

È stato inoltre registrato un andamento stagionale dei contagi, con picchi diversi a seconda della specie virale coinvolta: per PHEV è stato osservato il maggior numero di casi durante l'inverno, mentre AlphaCoV1 durante l'estate. Rispetto a quanto riportato da alcuni autori (Saif et al., 2019; Thakor et al., 2022; Vlasova et al., 2020) che riferiscono vi sia un picco invernale per i coronavirus in generale, questo è stato evidenziato solo per AlphaCoV1 e sarebbe auspicabile ripetere lo studio epidemiologico arruolando un più ampio campione di aziende.

In questo studio è stato rilevato come i tamponi rinofaringei siano più efficaci nella rilevazione di PHEV e AlphaCoV1, mentre quello rettale sembra essere meno sensibile. Per eventuali studi

futuri, soprattutto se effettuati su AlphaCoV1, è possibile valutare il solo utilizzo di campioni da secrezioni rinofaringee.

L'assenza di segni clinici diffusi rilevati durante il campionamento e/o riportati dai detentori degli animali indicano come i virus individuati circolino in maniera pressoché asintomatica poiché endemicamente presenti. Questo aspetto è confermato dall'analisi filogenetica che ha individuato la circolazione di una sola variante per AlphaCoV1 in tutto il territorio. Anche per l'infezione da PHEV si è evidenziata una sostanziale somiglianza tra le varianti circolanti con minime differenze tra i cluster rilevabili a livello di singola azienda. Questi risultati suggeriscono come PHEV sia in una fase endemica nelle aziende colpite e non vi sia attualmente una dispersione del virus tra aziende diverse, evento che invece sembra verificarsi per AlphaCoV1. Quest'ultimo necessita inoltre di maggiori studi implementando anche il sequenziamento del gene S per poter distinguere la sottospecie virale tra TGEV, PRCV o SECoV.

BIBLIOGRAFIA & SITOGRAFIA

Abdelrahman, Z., Li, M., & Wang, X. (2020). Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.552909

Alarcón, L. V., Alberto, A. A., & Mateu, E. (2021). Biosecurity in pig farms: a review. In *Porcine Health Management* (Vol. 7, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s40813-020-00181-z

Andries, K., & Pensaert, M. B. (1980). Virus isolated and immunofluorescence in different organs of pigs infected with hemagglutinating encephalomyelitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, *41*(2), 215–218.

Beltz, L. A. (2023). Coronaviruses of agricultural and companion animals with the potential for zoonotic transmission. In *Pathogenic Coronaviruses of Humans and Animals* (pp. 341–415). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-98809-4.00015-2

Buckley, A., Falkenberg, S., Martins, M., Laverack, M., Palmer, M. V., Lager, K., & Diel, D. G. (2021). Intravenous, intratracheal, and intranasal inoculation of swine with sars-cov-2. *Viruses*, *13*(8). https://doi.org/10.3390/v13081506

Cartwright, S., Lucas, M., Cavill, J., Gush, A., & Blandford, T. (1969). Vomiting and wasting disease of piglets. *Veterinary Record*, *84*(7), 175–176. https://doi.org/10.1136/vr.84.7.175

Domingo, J. L. (2022). An updated review of the scientific literature on the origin of SARS-CoV-2. *Environmental Research*, *215*. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114131

Dong, B. Q., Liu, W., Fan, X. H., Vijaykrishna, D., Tang, X. C., Gao, F., Li, L. F., Li, G. J., Zhang, J. X., Yang, L. Q., Poon, L. L. M., Zhang, S. Y., Peiris, J. S. M., Smith, G. J. D., Chen, H., & Guan, Y. (2007). Detection of a Novel and Highly Divergent Coronavirus from Asian Leopard Cats and Chinese Ferret Badgers in Southern China. *Journal of Virology*, *81*(13), 6920–6926. https://doi.org/10.1128/jvi.00299-07

Drzewnioková, P., Festa, F., Panzarin, V., Lelli, D., Moreno, A., Zecchin, B., De Benedictis, P., & Leopardi, S. (2021). Best Molecular Tools to Investigate Coronavirus Diversity in Mammals: A Comparison. *Viruses*, *13*(10), 1975. https://doi.org/10.3390/v13101975

Ferrara, G., D'Anza, E., Rossi, A., Improda, E., Iovane, V., Pagnini, U., Iovane, G., & Montagnaro, S. (2023). A Serological Investigation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome and Three Coronaviruses in the Campania Region, Southern Italy. *Viruses*, *15*(2). https://doi.org/10.3390/v15020300

Greig, A. S., Johnson, C. M., & Bouillant, A. M. (1971). Encephalomyelitis of Swine Caused by a Haemagglutinating Virus VI. Morphology of the Virus. *Research in Veterinary Science*, *12*(4), 305–309. https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34153-5

Johansson, M. A., Quandelacy, T. M., Kada, S., Prasad, P. V., Steele, M., Brooks, J. T., Slayton, R. B., Biggerstaff, M., & Butler, J. C. (2021). SARS-CoV-2 Transmission from People without COVID-19 Symptoms. *JAMA Network Open*, *4*(1). https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35057

Leopardi, S., Priori, P., Zecchin, B., Zamperin, G., Milani, A., Tonon, F., Giorgiutti, M., Beato, M. S., & De Benedictis, P. (2021). Interface between bats and pigs in heavy pig production. *Viruses*, *13*(1). https://doi.org/10.3390/v13010004

Leopardi, S., Terregino, C., & Paola, D. B. (2020). Silent circulation of coronaviruses in pigs. *Veterinary Record*, *186*(10), 323–323. https://doi.org/10.1136/vr.m932

Martelli, P., Lavazza, A., Nigrelli, A. D., Merialdi, G., Alborali, L. G., & Pensaert, M. B. (2008). Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Record*, *162*(10), 307–310. https://doi.org/10.1136/vr.162.10.307

Meekins, D. A., Morozov, I., Trujillo, J. D., Gaudreault, N. N., Bold, D., Carossino, M., Artiaga, B. L., Indran, S. V., Kwon, T., Balaraman, V., Madden, D. W., Feldmann, H., Henningson, J., Ma, W., Balasuriya, U. B. R., & Richt, J. A. (2020). Susceptibility of swine cells and domestic pigs to SARS-CoV-2. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 2278–2288. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1831405

Niederwerder, M. C., & Hesse, R. A. (2018). Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada. In *Transboundary and Emerging Diseases* (Vol. 65, Issue 3, pp. 660–675). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/tbed.12823

Pan, Y., Tian, X., Qin, P., Wang, B., Zhao, P., Yang, Y. Le, Wang, L., Wang, D., Song, Y., Zhang, X., & Huang, Y. W. (2017). Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Veterinary Microbiology*, *211*, 15–21. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.020

Pickering, B. S., Smith, G., Pinette, M. M., Embury-Hyatt, C., Moffat, E., Marszal, P., & Lewis, C. E. (2021). Susceptibility of domestic swine to experimental infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases*, *27*(1), 104–112. https://doi.org/10.3201/eid2701.203399

Quiroga, M. A., Cappuccio, J., Piñeyro, P., Basso, W., Moré, G., Kienast, M., Schonfeld, S., Cáncer, J. L., Arauz, S., Pintos, M. E., Nanni, M., Machuca, M., Hirano, N., & Perfumo,

C. J. (2008). Hemagglutinating Encephalomyelitis Coronavirus Infection in Pigs, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(3), 484–486. https://doi.org/10.3201/eid1403.070825

Saif, L. J., Wang, Q., Vlasova, A. N., Jung, K., & Xiao, S. (2019). Coronaviruses. In *Diseases of Swine* (pp. 488–523). wiley. https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch31

Sasaki, I., Kazusa, Y., Shirai, J., Taniguchi, T., & Honda, E. (2003). Neutralizing Test of Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus (HEV) in FS-L3 Cells Cultured without Serum. In *J. Vet. Med. Sci* (Vol. 65, Issue 3).

Sestak, K., Meister, R. K., Hayes, J. R., Kim, L., Lewis, P. A., Myers, G., & Saif, L. J. (1999). Active immunity and T-cell populations in pigs intraperitoneally inoculated with baculovirus-expressed transmissible gastroenteritis virus structural proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *70*, 203–221.

Sharun, K., Dhama, K., Pawde, A. M., Gortázar, C., Tiwari, R., Bonilla-Aldana, D. K., Rodriguez-Morales, A. J., de la Fuente, J., Michalak, I., & Attia, Y. A. (2021). SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. In *Veterinary Quarterly* (Vol. 41, Issue 1, pp. 181–201). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1921311

Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., … Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, *368*(6494), 1016–1020. https://doi.org/10.1126/science.abb7015

Sun Rui-Qin, Cai Ru-Jian, Chen Ya-Qiang, Liang Peng-Shuai, Chen De-Kun, & Song Chang-Xu. (2012). Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea in Suckling Piglets, China. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 18, Issue 1, pp. 161–163). https://doi.org/10.3201/eid1801.111259

Thakor, J. C., Dinesh, M., Manikandan, R., Bindu, S., Sahoo, M., Sahoo, D., Dhawan, M., Pandey, M. K., Tiwari, R., Emran, T. Bin, Dhama, K., & Chaicumpa, W. (2022). Swine coronaviruses (SCoVs) and their emerging threats to swine population, inter-species transmission, exploring the susceptibility of pigs for SARS-CoV-2 and zoonotic concerns. In *Veterinary Quarterly* (Vol. 42, Issue 1, pp. 125–147). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2079756

Turlewicz-Podbielska, H., & Pomorska-Mól, M. (2021). Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Virologica Sinica*, *36*(5), 833–851. https://doi.org/10.1007/s12250-021-00364-0

Vlasova, A. N., Wang, Q., Jung, K., Langel, S. N., Malik, Y. S., & Saif, L. J. (2020). Porcine Coronaviruses. In *Emerging and transboundary animal viruses* (pp. 79–110). https://doi.org/10.1007/978-981-15-0402-0_4

Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology*, *94*(7). https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20

Yan, Q., Liu, X., Sun, Y., Zeng, W., Li, Y., Zhao, F., Wu, K., Fan, S., Zhao, M., Chen, J., & Yi, L. (2022). Swine Enteric Coronavirus: Diverse Pathogen–Host Interactions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms23073953

Zhou, L., Li, Q. N., Su, J. N., Chen, G. H., Wu, Z. X., Luo, Y., Wu, R. T., Sun, Y., Lan, T., & Ma, J. Y. (2019). The re-emerging of SADS-CoV infection in pig herds in Southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, *66*(5), 2180–2183. https://doi.org/10.1111/tbed.13270

https://www.agi.it/

https://www.gazzettaufficiale.it/

https://covid19.who.int/region/euro/country/it

https://suivet.it/home-1.aspx

https://www.vetinfo.it/j6_statistiche/index.html#/

ALLEGATI

Allegato n° 1: Etichette dei dati e dei metadati utilizzate nel database finale

"Collection date"

"Farm ID"

"Region"

"Province"

"Shed ID"

"Movements of animals from other farms (Y/N)"

"Access of drivers to animal shelter (Y/N)"

"Truck disinfection (Y/ depends/ N) "

"Truck disinfection (Y/N) (No with depends)"

"PED /TGEV past year (Y/N)"

"Size (max n of individuals)"

"Size: S (<30-500); M (500-2000); L (>2000)"

"Type of farm (FAT: fattening only; REP: reproduction only; OC: all ages open cicle CC: all ages closed cicle; S (<30-500); M (500-2000); L (>3000)"

"Type of farm (FAT: fattening only; REP: reproduction only; OC: all ages open cicle CC: all ages closed cicle)"

"Outside access (Yes: Y; No: N; Yes covered: YC; Not registered: NR; open air: OA)"

"Dichotomic outside access (Yes: Y; No: N;)"

"Pavement G (grid); S (slit); F (full); So (soil); NR (not registered)"

"N boxes (NR: not registered)"

"Box ID for pivot (1dx-n dx and 1sx - n sx; NB same numbers are in front of each other, subsequent numbers are close to each other). NR: not registered"

"Box ID (1dx-n dx and 1sx - n sx; NB same numbers are in front of each other, subsequent numbers are close to each other). NR: not registered"

"Notes Box ID"

"N individuals/box"

"Animal ID"

"Age category (S:sow; W: wean (<30 kg); L:lean (30-90Kg); F:fat (>90kg))"

"Clinical signs"

"Total swabs"

"Anal swab"

“Anal swab count”

“Aanal swab virus species”

“Oral swab (<30kg)/nasal swab (all others)”

“Oral swab (<30kg)/nasal swab (all others) count”

“Oral swab (<30kg)/nasal swab (all others) virus species”

“Oral PHEV count”

“Oral TGE/PRCOV count”

“Positive animals”

“PHEV-positive animals”

“TGE/PRCOV-positive animals”

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto il Prof. Michele Drigo per avermi seguito e coinvolto in questo progetto, permettendomi di collaborare con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e di approfondire aree della veterinaria che non sono state solo prettamente mediche. Vorrei inoltre ringraziarlo per il tempo dedicatomi, soprattutto nelle fasi finali di stesura quando è sempre stato disponibile per ogni dubbio o chiarimento.

Un sincero ringraziamento va anche alla Dott.ssa Stefania Leopardi per avermi accolto in IZSVE, avermi permesso di conoscere questa realtà che spesso ci viene solamente nominata durante i nostri studi e per l'aiuto che ha fornito durante la scrittura dell'elaborato.

Ringrazio inoltre la Dott.ssa Francesca Festa che mi ha affiancato durante tutte le fasi di processazione dei campioni presso i laboratori di IZSVE, rendendosi sempre disponibile ad aiutarmi e a correggere i miei errori.

Un grazie speciale ai miei genitori Claudia e Claudio che hanno permesso che tutto questo potesse avverarsi e che, assieme a mia sorella Francesca, hanno sempre supportato le mie scelte e sopportato il mio carattere, non sempre così amabile, con impagabile pazienza anche durante le sessioni di esame più ostiche.

Grazie ai nonni Gabry e Franco che hanno creduto in me fin da quanto ho ricordi, ma anche a Teresa che mi ha sempre sostenuto e sono sicuro avrebbe continuato a farlo anche adesso.

Un caro ringraziamento va ai miei compagni di corso, in particolare Anna, Antonella, Aurora, Claudio, Edoardo, Elisa, Linda, Michele, Serena, Sofia, Valentina, con cui ho condiviso tantissimi momenti speciali e hanno reso indimenticabili questi cinque anni passati assieme.

E per ultimi, ma di certo non per importanza, ringrazio i Maranesi che, nonostante siano passati parecchi anni da quando ci siamo conosciuti, sono comunque rimasti un gruppo su cui ho sempre potuto contare anche durante gli anni vissuti a Legnaro. Grazie Flavio, Giulia, Laura, Lucia, Martina, Matteo, Mirko, Riccardo.