

**STUDIO LONGITUDINALE: RAPPORTO TRA STADIO DEL
CICLO RIPRODUTTIVO, NUMERO DI PARTI ED
ELIMINAZIONE FECALE DI *SALMONELLA* SPP. NELLE SCROFE.**

**REPRODUCTIVE CYCLE, NUMBER OF PARITIES AND
FECAL *SALMONELLA* SPP. EXCRETION IN SOWS:
A LONGITUDINAL STUDY**

**MAGISTRALI CHIARA FRANCESCA¹, D'AVINO NICOLETTA¹,
CIUTI FRANCESCA¹, CUCCO LUCILLA¹, MARESCA CARMEN¹,
PANICCIÀ MARTA¹, PETRINI STEFANO¹,
SCOCCIA ELEONORA¹, TENTELLINI MICHELE¹,
VALLI BEATRICE¹, VISCHI ORLANDO², PEZZOTTI GIOVANNI¹.**

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy*
² *Veterinario libero professionista*

Parole chiave: *Salmonella*, suino, gravidanza, eliminazione

Key words: *Salmonella*, swine, pregnancy, excretion

Riassunto. Scopo del lavoro è stato valutare, tramite uno studio di coorte, l'escrezione fecale di *Salmonella* in scrofe, con numeri di parti diversi, in diverse fasi del ciclo riproduttivo, in 2 allevamenti a ciclo chiuso del centro Italia. La popolazione target era costituita da primipare, pluripare con 1-5 parti e pluripare con più di 5 parti. Sono state considerate positive le scrofe dalle cui feci è stata isolata (ISO 6579:2002) *Salmonella* a diversi stadi di gestazione: preparto (14 giorni circa prima del parto), postparto1 (2-5 giorni dopo il parto), postparto2 (20 giorni circa dal parto), gestazione (24-31 giorni dopo il parto). È stata calcolata la densità d'incidenza in giorni per singolo momento fisiologico e l'incidenza cumulativa (L.C. 95%) per le 4 fasi considerate. Sono stati esaminati campioni ambientali prelevati dalle sale parto e box di gestazione, prima della introduzione degli animali. Gli isolati sono stati sierotipizzati (Kauffmann e White).

Nel preparto 1 animale è risultato positivo per *Salmonella*, nel postparto1 3 scrofe, nel postparto 26 scrofe e nella gestazione 27 scrofe. La densità di incidenza per *Salmonella* è risultata di 0,007 giorni per le primipare di 0,005 per le pluripare e di 0,001 per le pluripare >5. L'incidenza cumulativa è risultata dello 0,6% (I.C.95%=0%-2%) nel preparto, del 2% (I.C.95%=0%-4%) nel postparto1, del 4% (I.C.95%=1%-8%) nel postparto2 e del 27% (I.C.95%=18%-36%) nella gestazione. I sierotipi isolati sono stati Munchen e Typhimurium (primo allevamento) e 4,5,12:i- e Choleraesuis (secondo allevamento).

Dei tamponi ambientali effettuati sono risultati positivi per *Salmonella* spp 5/62 (8%) nelle sale parto e 28/120 (23%) nelle sale gestazione. Sono state isolate nel primo allevamento S. Munchen; nel secondo, *Salmonella* 4,5,12:i- e S. Typhimurium var. Copenhagen.

La velocità con la quale gli animali si infettano per *Salmonella*, così come evidenziato dalle stime di incidenza è massima negli animali più giovani e decresce all'aumentare dei numeri di parto. La gestazione è risultata essere un momento critico per l'escrezione di *Salmonella* spp. nelle scrofe probabilmente a causa di un *challenge* ambientale.

Abstract. The aim of the study was to evaluate, in a cohort study, the fecal excretion of *Salmonella* spp. in sows with different number of parities, in distinct periods of the reproductive cycle. Two integrated farms in central Italy have been included in the study. The target populations (166 animals) were primiparous and multiparous (1-5 and more than 5 parities) sows, tested in different periods of the reproductive cycle: 14 days before parturition (pre-partum) 2-5 days (post partum 1) and 20 days after parturition and gestation (24-31 days post partum). The subjects have been considered positive if *Salmonella* was isolated from faeces (according to ISO 6579:2002 standard). *Salmonella* isolates have been serotyped according to the Kauffmann White scheme. The density of incidence in days have been calculated for each period of the reproductive cycle and the cumulative incidence for the 4 periods considered has been also calculated.

In addition, environmental samples have been collected for farrowing rooms and gestation boxes, before the introduction of the sows.

During the pre-partum one single sow resulted positive, three during the post partum 1, six in the post partum 2 and 27 in the gestation.

The incidence density for *Salmonella* was 0,007 days for the group of primiparous sows, 0,005 days for the pluriparous (1-5) and 0,0001 days for the group with more than 5 parities.

The cumulative incidence resulted 0,6 % (I.C.95%=0%-2%) in pre-partum, 2% (I.C.95%=0%-4%) in post partum 1, 4% (I.C.95%=1%-8%) post partum 2 and 27% (I.C.95%=18%-36%) in gestation.

S. Munchen and *S. Typhimurium* were isolated from the sows in the first farm, while *S. Choleraesuis* and 4,5,12:i- were the two serotypes found in farm 2.

Salmonella was also isolated from the environmental samples collected in the farrowing rooms (5 out of 62; 8%) and the gestation boxes (28 out of 120; 23%).

S. Munchen was isolated from the first farm while *Salmonella* 4,5,12:i- and *S. Typhimurium* var. Copenhagen were isolated in the second farm.

The incidence values demonstrate that young sows tend to infect more rapidly than the older ones. Moreover, gestation represents a critical period for the excretion of *Salmonella*, probably related to environmental challenge.

INTRODUZIONE

Salmonella rappresenta ancora uno dei principali agenti di malattia di origine alimentare nell'uomo. Anche se il report EFSA 2007 (EFSA 2009) segnala un calo nel numero di casi di salmonellosi umana, questa rimane, con i suoi 151,995 casi registrati, la seconda zoonosi dopo la campilobatteriosi in Europa (EFSA 2009).

La carne suina, dopo la carne di pollo e le uova, è considerata una delle maggiori fonti di infezione per l'uomo, con l'1,1% di campioni di carne fresca positivi nel corso del 2007 (EFSA, 2009). La prevalenza osservata a livello linfonodale nei suini al macello è stata dello 10,3% all'interno dell'Unione Europea e di 16,5% in Italia nell'indagine

effettuata tra 2006 e 2007 in base a quanto previsto dal Regolamento (CE) 2160/2003 (EFSA 2008). Al fine di ridurre l'incidenza della salmonellosi nella Comunità Europea, sono allo studio interventi nei diversi settori della filiera della carne suina: l'approccio alla filiera nella sua globalità è infatti a tutt'oggi la strategia indicata per ottenere una riduzione della contaminazione nel prodotto finito.

Numerosi studi sono stati condotti a diversi livelli del processo produttivo (allevamento o *pre harvest*, trasporto o *harvest*, macellazione e trasformazione, *post-harvest*) per chiarire l'epidemiologia dell'infezione salmonellare ed individuare misure di controllo efficaci ed attuabili nella pratica.

Per quanto riguarda la fase di *pre-harvest*, sono state descritte numerose vie di trasmissione per i suini, e nonostante l'ambiente e la contaminazione indiretta rivestano un ruolo importante, alcuni studi hanno indicato come le scrofe possano giocare un ruolo nel mantenimento dell'infezione, in particolare negli allevamenti a ciclo chiuso, dove i contatti tra il settore riproduttivo e l'ingrasso sono generalmente più frequenti e protratti (Nollet, 2005). Gli animali portatori sono infatti considerati la fonte principale di infezione, sia per via diretta che per via indiretta, per gli altri animali (Carlson, 2001). In questo scenario, analogamente a quanto già effettuato nella filiera avicola, all'interno della Comunità si sta valutando la possibilità di intervenire sulle fasi 'alte' della filiera, cioè sui riproduttori, per ridurre la prevalenza di *Salmonella* negli allevamenti (EFSA, 2008).

Questo studio si proponeva lo scopo di indagare le dinamiche della infezione salmonellare in scrofe appartenenti a due allevamenti a ciclo chiuso dell'Italia centrale, e più in particolare, di delineare le correlazioni esistenti tra infezione, età degli animali e stadio del ciclo riproduttivo.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto nel periodo Dicembre 2006 – Novembre 2007 in due allevamenti a ciclo chiuso presenti in centro Italia. La popolazione target è stata suddivisa in scrofe primipare, pluripare con 1-5 parti e pluripare con più di 5 parti. Sono state considerate positive le scrofe dalle cui feci è stata isolata *Salmonella* a diversi stadi di gestazione: preparto (14 giorni circa prima del parto), postparto1 (2-5 giorni dopo il parto), postparto2 (20 giorni circa dal parto), gestazione (24-31 giorni dopo il parto).

Nei due allevamenti è stata selezionata una coorte di 166 animali, di cui 102 sono stati oggetto di campionamento per l'intero periodo previsto dallo studio. Gli animali sono stati identificati singolarmente con una marca auricolare, in maniera da poter essere seguiti lungo l'arco del ciclo riproduttivo. Sono stati campionati più gruppi di scrofe, appartenenti a bande differenti, e lungo tutto l'arco dell'anno solare.

I soggetti sono stati suddivisi come indicato in tabella 1. Per ciascun animale è stato effettuato un prelievo individuale di feci, approssimativamente 25 grammi, dall'ampolla rettale. In aggiunta sono stati prelevati 182 campioni ambientali dalle sale parto (#62) e gestazione (#120), mediante spugnette (sponge bags), strofinate sulle superfici (pareti, divisori dei box, pavimenti, gabbie parto, beverini, mangiatoie) prima dell'introduzione degli animali oggetto di campionamento.

Tutti i campioni prelevati sono stati conservati individualmente in contenitori sterili e mantenuti a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'analisi.

Per la ricerca di *Salmonella* da campioni fecali ed ambientali è stata seguita procedura descritta nella norma ISO 6579/2002. Per ciascun campione fecale positivo è stata isolato almeno un ceppo di *Salmonella* da sottoporre a sierotipizzazione secondo lo schema di Kaufman - White; da ciascun tampone ambientale positivo sono stati tipizzati cinque ceppi di *Salmonella* spp. Infine, i ceppi provenienti dal secondo allevamento sono stati ulteriormente discriminati mediante PFGE.

La PFGE è stata effettuata in base al protocollo Salmgene (Peters, 2003): la restrizione del DNA batterico è stata eseguita impiegando enzima XbaI (Promega). Le immagini ottenute sono state successivamente elaborate utilizzando il programma BIONUMERICS.

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata calcolando la densità d'incidenza in giorni per singolo momento fisiologico e l'incidenza cumulativa (L.C.95%) per le 4 fasi considerate.

RISULTATI

Nella fase di parto, un animale è risultato positivo per *Salmonella*, nel postparto1, tre scrofe, nel postparto2, sei scrofe e nella gestazione ventisette scrofe. La densità di incidenza per *Salmonella* è risultata di 0.007 giorni per le primipare di 0,005 per le pluripare e di 0,001 per le pluripare >5.

L'incidenza cumulativa è risultata dello 0,6% (I.C.95%=0%-2%) nel parto, del 2% (I.C.95%=0%-4%) nel postparto1, del 4% (I.C.95%=1%-8%) nel postparto2 e del 27% (I.C.95%=18%-36%) nella gestazione. I sierotipi isolati sono stati Munchen e Typhimurium (primo allevamento) e 4,5,12:i- e Choleraesuis (secondo allevamento).

Dei tamponi ambientali effettuati sono risultati positivi per *Salmonella* spp 5/62 (8%) nelle sale parto e 28/120 (23%) nelle sale gestazione. Sono state isolate nel primo allevamento S. Munchen; nel secondo, *Salmonella* 4,5,12:i- e S. Typhimurium var. Copenhagen.

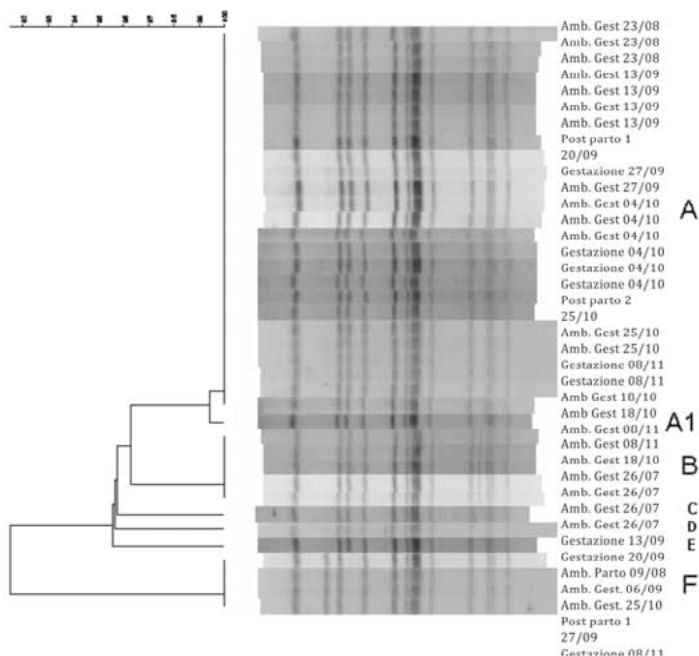
I ceppi di *Salmonella* 4,5,12:i- sono stati sottoposti a caratterizzazione mediante PFGE e i profili ottenuti analizzati mediante BIONUMERICS. L'albero filogenetico ottenuto è illustrato in Figura 1.

DISCUSSIONE

Complessivamente, il 6,6% dei campioni di feci prelevati dalle scrofe, indipendentemente dal numero di parto e dal momento del ciclo riproduttivo, hanno fornito esito positivo al test batteriologico. Questo conferma quanto osservato da altri autori che hanno registrato percentuali di positività all'esame batteriologico non superiori al 10% nelle scrofe (Kranker, 2003; Nollet, 2005). Per quanto riguarda i sierotipi isolati, nel corso di questo lavoro sono state isolate S. Typhimurium, S. Muenchen nel primo allevamento e S. Choleraesuis e S. 4,5,12:i- nel secondo. S. Typhimurium e S. 4,5,12:i-, si collocano rispettivamente al primo ed al quarto posto tra i sierotipi isolati nella Comunità Europea nei suini al macello (EFSA 2008). Questo elemento appare importante in rapporto alle finalità dello studio; è infatti noto che le caratteristiche epidemiologiche di un sierotipo di *Salmonella* possano essere differenti da quelle di un altro. Dati che si riferiscano ai sierotipi più diffusi nel suino e più importanti rispetto alla salute umana hanno perciò più immediato riscontro per identificare misure in grado di contenere il rischio di infezioni trasmesse dagli alimenti (Funk, 2001). Più autori hanno segnalato che l'eliminazione di *Salmonella* può variare tra un gruppo e

Figura 1: albero filogenetico in PFGE riferito agli isolati di Salmonella 4,5,12:i- nel secondo allevamento

Figure 1: PFGE profiles of the Salmonella 4,5,12:i- isolates from the second herd



l'altro di scrofe ed è stagionale (Funk, 2001; Carlson, 2001; Lurette, 2008); per questo motivo, la coorte è stata composta da animali appartenenti a bande diverse e il campionamento è stato effettuato lungo tutto il corso dell'anno solare.

Dall'analisi delle frequenze semplici è possibile osservare come gli animali più anziani presentino percentuali di escrezione inferiori. L'elaborazione statistica appare confermare questo dato: la velocità con la quale gli animali si infettano per *Salmonella*, infatti, così come evidenziato dalle stime di incidenza, è massima negli animali più giovani e decresce all'aumentare dei numeri di parto. Questo dato è in accordo a quanto osservato da Nollet et al. nel 2005, e può essere attribuito ad una maggiore copertura del sistema immunitario nelle scrofe più anziane.

Per quanto riguarda i diversi stati del ciclo riproduttivo, l'analisi delle percentuali di scrofe eliminatrici di *Salmonella* indica la gestazione come il momento più a rischio per l'escrezione, come già segnalato da altri autori (Nollet, 2005, Funk, 2001).

Anche in questo caso, l'analisi statistica ha permesso di confermare queste osservazioni, dal momento che l'incidenza cumulativa è decisamente superiore in gestazione rispetto alle altre fasi del ciclo riproduttivo. Il fatto che la gestazione costituisca un momento a rischio per l'eliminazione di *Salmonella* è stata attribuita a diversi fattori, tra cui il diverso livello di igiene delle strutture rispetto alle sale parto, e la presenza di stress legati allo svezzamento. Funk e coll. (2001) hanno ipotizzato che anche il contenuto in acqua delle feci, maggiore in lattazio-

ne rispetto alla gestazione, possa avere un'influenza sulla maggiore escrezione di *Salmonella* in questo periodo.

Nel corso di questo lavoro, i dati del campionamento ambientale indicano una maggiore contaminazione delle sale gestazione, prima dell'introduzione degli animali oggetto di campionamento. Questo fatto può essere ricondotto a una diversa gestione dei due ambienti, infatti in tutte e due le aziende le sale parto vengono gestite in tutto pieno e tutto vuoto, mentre le sale gestazione sono gestite in flusso continuo. È noto che la contaminazione residua di *Salmonella* in un ambiente influenza la prevalenza di suini eliminatori introdotti in quell'ambiente (Lurette, 2008).

Il fatto che le scrofe si infettino in sala gestazione può quindi essere giustificato da un maggiore challenge ambientale e quindi da una trasmissione indiretta dell'infezione. Questo dato è confermato dalla corrispondenza tra i sierotipi isolati nei box gestazione e dalle scrofe introdotte successivamente negli stessi ambienti. A supporto di questa ipotesi infatti, nel primo allevamento S. Munchen è stata isolata nelle sale gestazione, e successivamente le scrofe trasferite in questo ambiente hanno eliminato lo stesso sierotipo nelle feci.

Nel secondo allevamento S. 4,5,12:i- è stata isolata a più riprese dagli ambienti e dagli animali, per cui la stessa correlazione non è dimostrabile. La caratterizzazione molecolare, effettuata tramite PFGE, non è infatti riuscita a discriminare i diversi stiptipi di S. 4,5,12:i- circolanti. Poiché questa azienda effettuava una rimonta interna da anni è probabile che questo stiptipe circolasse nella popolazione di scrofe da tempo.

CONCLUSIONE

In conclusione il lavoro effettuato rafforza l'opportunità di una corretta gestione delle sale di gestazione per un efficace contenimento dell'infezione negli allevamenti suini da riproduzione. I risultati suggeriscono inoltre una corretta pianificazione delle rimonte, per evitare di avere un eccesso di soggetti al primo parto, maggiormente esposti alla infezione da *Salmonella*. In termini più direttamente legati alla contaminazione delle carni, deve essere sottolineato come la maggiore frequenza di soggetti positivi nella fase di gestazione possa rappresentare un rischio superiore per la contaminazione finale delle carcasse, considerato il fatto che proprio da questi settori originano gli animali da riforma destinati al macello.

Bibliografia

- Carlson, A.R., Blaha, T. (2001). In-herd prevalence of *Salmonella* in 25 selected Minnesota swine farms. *Journal of Swine Health and Production*. 9: 7-10.
- European Food Safety Authority. (2006). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to "Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production". *The EFSA Journal* 341, 1 – 131.
- European Food Safety Authority. (2008). Report of the Task Force on Zoonoses data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *The EFSA Journal* 135,1-111.

- European Food Safety Authority. (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, The EFSA Journal 223.
- Funk J. A., Davies P. R., Nichols M. A. (2001). Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production system. Vet. Microbiol. 83: 45-60.
- Griffith R. W. (2006). Salmonella. In. Diseases of Swine. Straw B., Zimmermann, J., D’Allaire, S., Taylor D. J. Blackwell Publishing. IX Edition. 739-754.
- Kranker, S., Alban, L., Boes, J.; Dahl, J. (2003). Longitudinal study of *Salmonella* enterica Serotype Typhimurium infection in three Danish farrow to finish swine herds. Journal of Clinical Microbiology 41: 2282-2288.
- Lurette, A., Belloc, C., Touzeau, S., Hoch, T., Ezanno, P., Seegers, H., Fourichon, C. (2008). Modelling Salmonella spread within a farrow-to-finish pig herd. Vet. Res. 39:49
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., De Kruif, A., De Zutter, L. , De Zutter, L., Maes, D. (2005). *Salmonella* in sows : a longitudinal study in farrow to finish pig herds. Vet. Res. 36: 645-656
- Peters T.M., Maguire C., Threlfall E.J., Fisher I.S., Gill N., Gatto A.J., Salm-gene project (2003). “The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting”. Euro Surveill. 8(2), 46-50.

Tabella 1: numeri di animali testati per Salmonella

Table 1: Animals tested for Salmonella

| MOMENTO | CATEGORIA DI PARTO | | | | | | | |
|-------------|--------------------|-------|-----------|-------|-------------|-------|--------|--------|
| | Primipare | | Pluripare | | Pluripare>5 | | Totale | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| PREPARTO | 45 | 27,8% | 52 | 32,1% | 65 | 40,1% | 162 | 100,0% |
| POST PARTO1 | 42 | 27,3% | 51 | 33,1% | 61 | 39,6% | 154 | 100,0% |
| POST PARTO2 | 38 | 27,5% | 51 | 37,0% | 49 | 35,5% | 138 | 100,0% |
| GESTAZIONE | 35 | 34,3% | 44 | 43,1% | 23 | 22,5% | 102 | 100,0% |

Tabella 2: Percentuale di animali e campioni risultati positivi per Salmonella

Table 2: Percentage of animals and samples positive for Salmonella

| Momento | Primipare | | Pluripare | | Pluripare > 5 | | Totale animali | |
|-----------------|-----------|------------|-----------|------------|---------------|------------|----------------|------------|
| | Testate | % positive | Testate | % positive | Testate | % positive | Testate | % positive |
| PREPARTO | 45 | 0,6% | 52 | 0,0% | 65 | 0,0% | 162 | 0,6% |
| POST PARTO1 | 42 | 1,9% | 51 | 0,0% | 61 | 0,0% | 154 | 1,9% |
| POST PARTO2 | 38 | 0,7% | 51 | 2,9% | 50 | 0,7% | 138 | 4,3% |
| GESTAZIONE | 35 | 10,8% | 44 | 12,7% | 23 | 2,9% | 102 | 26,5% |
| Totale campioni | 160 | 10% | 198 | 8,5% | 198 | 2,0% | 556 | 6,6% |