

INDAGINE IN CAMPO SULLA DIFFUSIONE DELLA CISTITE DELLA SCROFA

FIELD SURVEY ON THE DISTRIBUTION OF SOWS CYSTITIS

GRATTAROLA C.¹, MASSA M.³, BELLINO C.², BOTTA E.³, DONDO A.¹, MAGGI E.², MINISCALCO B.², VARNAVA' D.⁴, ZOPPI S.¹, CAGNASSO A.²

¹ I.Z.S. Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Torino;

² Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino;

³ Medico Veterinario Libero Professionista, Torino, Scuola di Specializzazione in Patologia Suina di Moretta (CN),

Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino;

⁴ Medico Veterinario Libero Professionista, Torino.

Parole chiave: cistite, scrofa, allevamento

Key words: cystitis, sow, farm

Riassunto. Il seguente studio si propone di valutare la presenza della patologia in scrofe di 7 allevamenti siti in provincia di Cuneo e di Torino. Le indagini sono state condotte su 250 scrofe distinte in 4 classi (primipare, in gestazione e in lattazione, e pluripare, in gestazione e lattazione). 57 campioni (22,8%) hanno evidenziato batteriuria significativa.

Abstract. The following study aims to assess the presence of the disease in sows of 7 farms sites in the province of Cuneo and Turin. The surveys were conducted on 250 sows divided into 4 classes (primiparous, gestation and lactation, multiparous, gestation and lactation). 57 samples (22,8%) showed significant bacteriuria.

INTRODUZIONE

Le infezioni del tratto urinario della scrofa (Urinary Tract Infections- UTI) rappresentano una delle principali cause di mortalità e riforma delle scrofe, predisponendo gli animali a infezioni dell'utero gravido e, attraverso l'ambiente, anche a mastiti post-partum. In alcune realtà produttive come quella francese e statunitense sono ritenute sanitarimente ed economicamente rilevanti per le ripercussioni negative sui parametri riproduttivi (bassa prolificità, ritorni in calore, parti languidi, natimortalità eccessiva). L'interesse per le UTI è cresciuto in anni recenti, in concomitanza con l'intensificazione della produzione e l'evoluzione delle conoscenze sulle batteriosi opportunistiche.

Le infezioni si dividono in aspecifiche e specifiche: le prime, localizzate alla vescica, originano essenzialmente dalla contaminazione fecale perineale, per colonizzazione di vagina e uretra da parte di microrganismi di origine enterica, cutanea o ambientale, hanno spesso andamento cronico e raramente presentano sintomatologia evidente; le seconde, più rare e ad evoluzione acuta, con coinvolgimento anche delle alte vie urinarie e dei reni, sono riferibili ad *Actinobaculum suis*, microrganismo commensale del diverticolo prepuziale del verro. (2) Difficile è la quantificazione della reale incidenza della problematica, a causa, soprattutto, delle difficoltà che si incontrano nella diagnosi sugli animali in vita. Ci si è proposti pertanto di mettere a punto e sperimentare protocolli diagnostici in vita per la diagnosi in campo di tali patologie, soprattutto per quanto riguarda gli aspetti diagnostici ed epidemiologici, e di valutarne la diffusione negli allevamenti suini piemontesi.

E' stato sperimentato un approccio diagnostico basato sull'affiancamento dell'esame

batteriologico qualitativo, mirato alla ricerca della totalità di microrganismi potenzialmente coinvolti, e all'esame batteriologico quantitativo, mirato alla valutazione del ruolo patogeno dei microrganismi aerobi isolati (carica batterica totale- CBT). Al fine di definire i parametri più sensibili per la diagnosi di cistite, sono stati effettuati dei prelievi di urina, comparando i risultati dell'esame fisico-chimico con gli esiti dell'esame batteriologico. Per l'acquisizione di protocolli applicabili in routine sono state messe a punto modalità operative relative a tecniche di prelievo, esecuzione degli esami diagnostici e interpretazione dei risultati, da adattare in base ai risultati conseguiti e ai limiti evidenziati. (1)

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato realizzato con la collaborazione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta e del Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino.

Le indagini sono state effettuate in allevamenti suinicoli situati nelle due province piemontesi con più elevata densità suinicola (Cuneo e Torino) e con anamnesi relativa a cistiti croniche. Il campionamento è stato effettuato su scrofe in fase di gestazione ed in fase di lattazione. I prelievi di urina sono stati effettuati su 4 classi di animali (primipare, in gestazione (1 G) e in lattazione (1 L), e pluripare, in gestazione (4 G) e in lattazione (4 L)).

E' stato valutato idoneo un numero di campioni complessivo pari a 240, di cui 60 per ognuna delle 4 classi individuate.

Sono state prelevate a random le prime urine del mattino per minzione spontanea da mitto intermedio. I campioni rappresentati da due aliquote di circa 20 ml di urina ciascuna, sono stati raccolti in contenitori sterili per le successive analisi.

L'aliquota destinata all'esame batteriologico è stata stoccata a temperatura di refrigerazione e processata entro 4 ore dal prelievo presso il laboratorio di batteriologia.

La restante aliquote è stata utilizzata per la determinazione dei parametri fisico-chimici effettuata direttamente in allevamento e per l'esame del sedimento, eseguito successivamente presso il Laboratorio.

Esame fisico-chimico e del sedimento

Per ogni campione prelevato sono stati valutati visivamente i parametri fisici (colore e torpidità) e, con l'utilizzo di test strip (Multistix® 10 SG -Siemens), i parametri biochimici (glucosio, bilirubina, corpi chetonici, pH, sangue, proteine, urobilinogeno, nitriti e leucociti). Presso il Laboratorio del Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino i campioni di urina sono stati centrifugati a 1500 rpm per 5 minuti, e successivamente è stata misurata la densità del surnatante con metodo refrattometrico; un quantitativo di precipitato pari a circa 0,5 ml è stato risospeso e sottoposto ad esame microscopico per evidenziare eventuali componenti cellulari (RBC-globuli rossi, WBC-leucociti, cellule epiteliali), calcoli, cristalli, batteri ed eventuali contaminanti.

Esame batteriologico:

Per l'esame batteriologico sull'urina (eseguito presso il Laboratorio di Patologia Animale, Istituto Zooprofilattico, Torino) è stato predisposto un esame qualitativo, basato sull'utilizzo di Columbia Blood Agar, e incubazione simultanea in aerobiosi (per 24 ore), microaerofilia (CO₂ al 5%) (per 24-48 ore) e anaerobiosi (per 48-120 ore), e di Mac Conkey Agar, in aerobiosi (per 24 ore), al fine di rivelare la presenza di tutti i potenziali agenti patogeni coinvolti nelle infezioni urinarie della scrofa, e un esame quantitativo (carica batterica totale- CBT), mirato alla valutazione del ruolo patogeno dei microrganismi aerobi isolati.

Per la determinazione della carica batterica aerobica totale per ml (CBT) si è provveduto a diluire ogni campione di urina in proporzione 1:100; 0,1 ml di tale diluizione è stato

distribuito uniformemente su una piastra di Columbia Blood agar con l'ausilio di una spatola sterile, e la piastra è stata incubata a 37°C per 24 h. E' stato quindi eseguito il conteggio delle colonie sviluppatesi e, tenendo conto del fattore di diluizione e della quantità seminata, è stata calcolata la carica batterica/ml (UFC/ml).

Come criterio interpretativo la carica è stata considerata significativa in presenza di valori >10⁵ (100.000 UFC/ml), di dubbia interpretazione con valori compresi tra 10⁴ e 10⁵, mentre valori inferiori a 10⁴ sono stati considerati non significativi (riferibili, nel caso di controllo delle urine prelevate in vivo, a contaminazioni di origine esogena (fecale) o flora microbica saprofitica presente in uretra, vestibolo vaginale e vulva).

Si è provveduto all'identificazione delle specie batteriche sviluppatesi in aerobiosi presenti in coltura pura o in numero di colonie >20 per piastra, laddove la carica batterica totale per ml risultava >10⁵ o compresa tra 10⁴ e 10⁵; per la crescita in microaerofilia e in anaerobiosi si è proceduto all'identificazione delle colonie macroscopicamente non assimilabili a quelle sviluppatesi in condizioni di aerobiosi, indipendentemente dal valore della CBT riscontrata. L'identificazione dei ceppi batterici è stata condotta con l'ausilio di gallerie API miniaturizzate o con sequenziamento con Microseq500[®], in casi di difficile interpretazione e in caso di sospetta presenza di *Actinobaculum suis*.

Per la valutazione della positività all'esame batteriologico sono stati considerati in parallelo il valore della carica batterica aerobica totale, le tipologie di microrganismi isolati e le relative condizioni di crescita (es. isolamento esclusivo in microaerofilia o anaerobiosi).

I campioni che presentavano crescita batterica non significativa (CBT < 10⁴, crescita di flora mista o in numero di colonie < 20 per piastra) o nulla, sono stati considerati negativi.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software R v 1.8.0. I dati ottenuti sono stati sottoposti a statistica descrittiva ed analitica, al fine di evidenziare la presenza di associazioni significative tra la positività all'esame batteriologico, i parametri fisico-chimici dell'urina e le caratteristiche dell'allevamento. Per la statistica analitica la normalità di distribuzione della popolazione è stata testata con il test di Shapiro Wilk o di Kolmogorov Smirnov dove opportuno. Le variabili numeriche sono state testate con il test t di Student per dati indipendenti, mentre le variabili categoriche sono state testate con il test del χ^2 . Per tutte le analisi è stato considerato statisticamente significativo un livello di significatività $\alpha = 0,05$.

RISULTATI

Sono stati esaminati complessivamente 250 campioni di urina, provenienti da 7 diversi allevamenti.

Di seguito vengono riportate le caratteristiche degli allevamenti studiati.

CARATTERISTICHE ALLEVAMENTI (N=7)									
CICLO		FECONDAZIONE	MEDIA PARTI SCROFA/ ANNO	PERIODO INTERPARTO MEDIO	MEDIA SUINETTI SVEZZATI/ ANNO	TP/ TV	USO ANTIBIOTICI	PULIZIA SALA GESTAZIONE	
APERTO	CHIUSO	ARTIFICIALE	2,1-2,4	118-154	10,4-11	7 SU 7	7	QUOTIDIANA	5
4	3	7						SALTUARIA	2

Tab. 1 : *Caratteristiche dell'allevamento*

Tab.1 : *Features livestock*

La distribuzione del campionamento per classi di animali nei 7 allevamenti considerati è stata pari a:

Classe 1° G	Classe 1° L	Classe 4° G	Classe 4° L
66 (26,4%)	49 (19,6%)	75 (30%)	60 (24%)

Tab 2: Distribuzione dei campioni per classe selezionata

Tab. 2: Breeding: sampling distribution for classes

Dei 250 campioni 57 (22,8%) hanno evidenziato batteriuria significativa, e sono stati pertanto considerati campioni positivi, mentre 193 (77,2%), sterili o con batteriuria non significativa, sono stati considerati negativi; in 44 si è isolata un'unica specie batterica (*E.coli* in 28 casi), in 12 due specie batteriche, e in 1 campione più di due specie batteriche.

Come si può osservare nella tabella successiva sono state svelate essenzialmente infezioni aspecifiche riferibili soprattutto a microrganismi di origine fecale, con netta predominanza coli bacillare.

CAMPIONI POSITIVI	N° (%)	MICROORGANISMO	N°
per 1 specie batterica (isolamento in purezza)	44(77%)	<i>Escherichia coli</i>	28
		<i>Proteus spp</i>	2
		<i>Staphylococcus spp (aureus, simulans, hominis)</i>	3
		<i>Streptococcus spp (suis, dysgalactiae, parasanguinis)</i>	5
		<i>Kokuria rosea</i>	1
		<i>Mannheimia haemolytica</i>	1
		<i>Pasteurella mairii</i>	1
		<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	1
		<i>Enterococcus caecorum</i>	1
		<i>Moraxella spp</i>	1
per 2 specie batteriche	12(21%)	<i>Escherichia coli, Proteus spp</i>	3
		<i>Streptococcus parasanguinis, Corynebacterium striatum</i>	1
		<i>Actinomyces hyovaginalis, Actinobacillus rossii</i>	1
		<i>Escherichia coli, Streptococcus galloliticus</i>	1
		<i>Corynebacterium glucoronolyticum, Kokuria rosea</i>	1
		<i>Escherichia coli, Pseudomonas alcaligenes</i>	1
		<i>Escherichia coli, Streptococcus suis</i>	1
		<i>Escherichia coli, Staphylococcus simulans</i>	2
<i>Escherichia coli, Staphylococcus chromogenes</i>	1		
per più di 2 specie batteriche	1(2%)	<i>Streptococcus dysgalactiae, Mannheimia haemolytica, Staphylococcus xilosus</i>	1
Totale	57		

Tab.3: Urine dei capi controllati in allevamento: positività batteriologica

Tab 3: Urine of animals in the herd tested: a positive bacteriological

La batteriuria significativa non è risultata indipendente dalla fase del ciclo produttivo: i campioni considerati positivi si sono rivelati infatti significativamente superiori nella fase di lattazione e nella fase di gestazione delle scrofe pluripare (χ^2 $p < 0,001$).

Batteriuria significativa	Classe 1° G	Classe 1 °L	Classe 4°G	Classe 4°L	Totale
NEG	60 (91%)	39 (79%)	58 (77%)	36 (60%)	193 (77%)
POS	6 (9%)	10 (21%)	17 (23%)	24 (40%)	57 (23%)
Totale	66	49	75	60	250

Tab. 4: *Distribuzione dei campioni positivi per classe selezionata*

Tab. 4: *Distribution of samples positive for the selected class*

E' stata osservata una associazione statisticamente significativa fra l'età e la batteriuria nelle scrofe pluripare, indipendentemente dalla fase di produzione. (χ^2 $p < 0,001$)

Fase	Es. batteriologico	
	+	-
Pluripare	41	94
Primipare	16	99

Correlazione tra positività batteriologica e parametri fisico-chimici

Circa la correlazione tra positività batteriologica e parametri fisico-chimici, è stata riscontrata una associazione statisticamente significativa fra la batteriuria e la positività ai nitriti e l'emoglobinuria.

Correlazione tra positività batteriologica e caratteristiche del sedimento

Circa la correlazione tra positività batteriologica e caratteristiche del sedimento è stata riscontrata una associazione statisticamente significativa fra batteriuria e presenza di globuli rossi (RBC), presenza di leucociti (WBC), cellule epiteliali, presenza di batteri intracellulari nei leucociti.

DISCUSSIONE - CONCLUSIONI

Le percentuali di affezioni urinarie riscontrate sui soggetti esaminati in vita evidenziano positività nel 22,8% dei casi.

Anche se non è stato possibile rispettare perfettamente lo schema di campionamento prefissato per difficoltà a reperire un numero sufficiente di soggetti della classe 1°L (49 anziché 60), il campionamento effettuato, pari a 250 campioni complessivi, risulta ampiamente rappresentativo e conferma una diffusione elevata della patologia negli allevamenti del nostro territorio, significativamente superiore nei soggetti in fase di lattazione, e in fase di gestazione nelle scrofe pluripare.

I campioni di urina risultati positivi all'esame batteriologico con isolamento di specie batterica unica (in purezza) sono risultati il 77%.

In tutti gli isolamenti in purezza la specie batterica maggiormente isolata è stata *E.coli* (28 su 44), e rilevanti sono risultati i riscontri di batteriuria significativa causata in singolo da microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* (*aureus*, *simulans*, *hominis*), *Streptococcus* (*suis*, *dysgalactiae*, *parasanguinis*), *Enterococcus* (*caecorum*).

Tali riscontri indicano che, nella maggioranza dei casi di cistite evidenziati, gli agenti causali corrispondono a microrganismi responsabili di infezioni aspecifiche, appartenenti a flora endogena e opportunistica tipicamente localizzata nelle basse vie urinarie.

Il riscontro di batteriuria è risultato significativamente associato alla fase produttiva dell'animale indipendentemente dalle caratteristiche dell'allevamento campionato.

Dal punto di vista degli aspetti gestionali, tutte le aziende presentavano standards igienici e di pulizia da considerarsi soddisfacenti. In una sola azienda la quantità di feci presenti nelle gabbie di allevamento è stata considerata non soddisfacente. Tuttavia, in questa azienda veniva praticata la somministrazione preventiva di antibiotici nel periodo peripartale, al fine di prevenire le patologie che frequentemente interessano le scrofe in questa fase produttiva. Questa pratica potrebbe avere influenzato la casistica di positività in quest'ultimo allevamento, che mostrava le caratteristiche sanitarie più scadenti se comparato con gli altri.

I risultati hanno evidenziato un'associazione significativa fra la presenza di batteriuria e l'età degli animali: il maggior numero di campioni positivi è stato riscontrato nelle scrofe pluripare oltre al quarto parto, in particolare in quelle in lattazione, seguite dalle scrofe oltre al quarto parto in gestazione.

Il test rapido utilizzato in campo (cartine Multistix) si è dimostrato di pratico e veloce utilizzo, tuttavia poco sensibile nell'identificare la batteriuria. Gli unici due parametri associati significativamente alla presenza di batteriuria sono stati i nitriti (in 11 campioni su 57) e l'emoglobinuria (in 9 campioni su 57). Tali parametri sono risultati associati in maniera significativa alla positività batteriologica ma con una bassa sensibilità diagnostica. Per quanto concerne la presenza di nitriti, è da considerare che un numero così basso di positività potrebbe essere dovuto al fatto che non tutti i batteri nel loro metabolismo producono nitriti. Un'altra possibile spiegazione ad una così bassa percentuale di positività per questo parametro è che gli animali affetti da cistite tendono ad urinare più frequentemente. La permanenza dell'urina in vescica per un periodo più ridotto di tempo non permetterebbe ai batteri eventualmente presenti di ridurre i nitrati in nitriti in una quantità identificabile dal test da campo.

L'esame microscopico del sedimento si è dimostrato di maggiore utilità diagnostica per l'evidenziazione di batteriuria. I campioni di urina con esame batteriologico positivo dal punto di vista microscopico presentavano ematuria, piuria, presenza di batteri e cellule epiteliali.

La presenza di cellule epiteliali nella maggior parte dei campioni con batteriuria (44 su 57) potrebbe essere imputata ai fenomeni di sfaldamento della mucosa vescicale che si verificano durante i processi infiammatori.

Alla luce dei risultati globali ottenuti si può affermare che:

- l'esecuzione dell'esame batteriologico secondo le modalità adottate, ovvero affiancamento di esame qualitativo e quantitativo, utilizzo di campioni di urina prelevati da mitto intermedio, esame allestito entro 6 h al max dal prelievo, conservazione dei campioni a + 4°C, utilizzo di terreni agarizzati non selettivi (Columbia Blood Agar e McConkey Agar), incubazione simultanea in aerobiosi, microaerofilia e anaerobiosi, prolungata fino a 5 gg, si è dimostrata idonea all'applicazione anche in protocolli diagnostici in routine; è però di fondamentale importanza la disponibilità di metodiche di identificazione batterica avanzate, quali il sequenziamento, da affiancare alle tradizionali metodiche di identificazione biochimica con sistemi miniaturizzati, per consentire agevoli interpretazioni diagnostiche anche in casi di difficile interpretazione (vedi ad esempio *Helicobacter* spp, e in casi di sospetta presenza di patogeni specifici urinari quali *Actinobaculum suis*).

- l'esecuzione dell'esame del sedimento può essere considerata idonea anche in protocolli in routine.

Ai fini applicativi si può suggerire, per uno screening delle cistiti in allevamento

- l'esecuzione di un prelievo dal mitto intermedio di tutti i soggetti a rischio;
- la valutazione macroscopica della torbidità e conseguente selezione dei campioni da sottoporre ad indagini successive;
- l'esame del sedimento di un pool di urina di 10 animali

In caso di riscontro suggestivo di anomalie, sull'urina dei 10 animali del gruppo potrebbe

essere eseguito l'esame batteriologico, preferibilmente in singolo, ove applicabile, per l'individuazione dei soggetti con patologia in atto, richiedendo anche eventuale antibiogramma.

Una non corretta gestione e pulizia delle strutture, con conseguente accumulo di feci, può predisporre alla colonizzazione delle vie urinarie per via ascendente da parte di microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee, quali ad esempio *E.coli*, che in numerosi casi è stato individuato come unica specie batterica coinvolta. Fondamentale, ai fini di una regolare urinazione, per la prevenzione delle infezioni ascendenti, è senz'altro la disponibilità di acqua ad libitum.

BIBLIOGRAFIA

1. Biksi I., Takacs N., Vetesi F., Fodor L., Szenci O., Fenyó E. (2002) "Association between endometritis and urocystitis in culled sows", *Acta Veterinaria Hungarica* 50(4), 413-423.
2. Sala V. (2007) "Significato e importanza delle infezioni urinarie della scrofa" *Summa, An. Redd.* 2(3), 43-47.
3. Madeleine Chagnon, Sylvie D'Allaire and Richard Drolet (1991) "A prospective study of sow mortality in breeding herds." *Can J Vet Res* 1991; 55, 180-1847. Y. Sasaki and Y. Koketsu (2008) "Mortality, death interval, survivals and herd factors for death in gilts and sows in commercial breeding herds." *J. Anim. Sci.* 2008. 86, 3159-3165
4. Glen Almond (2005) "An assesment of urinary tract infection in sows."
5. N. Abiven, H. Seegers, F. Beaudeau, A. Laval and C. Fourichon (1998) "Risk factors for high sow mortality in French swine herds." *Preventive Veterinary Medicine* 33 (1998) 109-119
6. Xaver T. P. Glock, Gabor Bilkei (2005) "The effect of postparturient urogenital diseases on the lifetime reproductive performance of sows." *Can Vet J* 46, December 2005
7. G. W. Almond, L. G. Simpson, M. S. Nemecek, P. A. Routh (2006) "Urine abnormalities in lactating sows." *Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006 Vol. I*
8. Euzéby, J.P. : Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. *Actinobaculum, Actinobaculum suis*
9. Porcine Cystitis-pyelonephritis Complex
<http://merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/130303.htm> Accessed november 21/2008
© 2008; Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ USA
10. LAWSON (P.A.), FALSEN (E.), ÅKERVALL (E.), VANDAMME (P.) et COLLINS (M.D.) (1997) Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 899-903.
11. LIEBHOLD (M.), WENDT (M.), KAUP (F.J.) et DROMMER (W.) (1995) Clinical, and light and electron microscopical findings in sows with cystitis. *Vet. Rec.*, 137, 141-144.
12. WALKER (R.L.) et MACLACHLAN (N.J.) (1989) Isolation of *Eubacterium suis* from sows with cystitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195, 1104-1107.
13. Groehs Goldberg A.M.(2007) Manual de urinalise suina!da coleta a analise dos resultados- Universidade federal do rio grande do sul , Porto Alegre