

**EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE IN FASE
PRE-MACELLAZIONE DI UNA FONTE DI ACIDO FORMICO E
ACIDO CITRICO PROTETTO (FORMYL®) SULLA PREVALENZA
DI SUINI PORTATORI DI SALMONELLA SPP. AL MACELLO**

***EFFECT OF PRE-SLAUGHTER DIET INTEGRATION WITH A
PROTECTED SOURCE OF FORMIATE AND CITRIC ACID
(FORMYL®) UPON THE PREVALENCE OF SALMONELLA SPP
CARRIER SLAUGHTER PIGS***

MERIALDI G.¹, FONTANA M.C.¹, TALLARICO N.⁴, TURCI S.²,
LEONELLI R.³, GALLETTI G.¹, VINCENZI E.⁴,
RUGNA G., BONILAUDI P.³

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna,
Sezione Diagnostica di Bologna*

²*Veterinario Libero Professionista (Reggio Emilia)*

³*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna,
Sezione Diagnostica di Reggio Emilia*

⁴*Soda Feed Ingredients (Monaco)*

Parole chiave: suino, *Salmonella*, acido formico

Keywords: swine, *Salmonella*, formic acid

Riassunto. In una prova di campo è stata testata l'efficacia di un additivo zootecnico incapsulato a base di una fonte di acido formico e acido citrico (Formyl®) nel ridurre la prevalenza di soggetti portatori di *Salmonella* spp. nei linfonodi mesenterici e nel contenuto ciecale al momento della macellazione. La prova è stata condotta su suini provenienti da un allevamento a ciclo chiuso sito in Emilia Romagna dove era stato precedentemente registrato un elevato tasso di sieropositività nei confronti di *Salmonella*. Il gruppo trattato ha ricevuto la dieta di finissaggio con l'aggiunta di 4 Kg di Formyl® per tonnellata di mangime negli ultimi 30-50 giorni prima della macellazione, mentre al gruppo di controllo è stata somministrata la dieta commerciale dell'azienda. Al momento della macellazione per ogni partita (sia dal gruppo trattato che dal gruppo di controllo) si è proceduto a prelevare dagli stessi soggetti un campione di contenuto ciecale ed un campione di linfonodi mesenterici, per un totale di 100 soggetti nel gruppo di controllo e di 104 soggetti nel gruppo trattato. Dai campioni è stata eseguita la ricerca di *Salmonella* spp. Attraverso un test standard. La prevalenza di soggetti portatori è risultata significativamente inferiore nel gruppo trattato (28,8%), rispetto al gruppo di controllo (43%).

Abstract. This field trial was carried out to determine the effects of feed acidification with a protected source of formiate and citric acid (Formyl®) upon *Salmonella* carriage in market-age pigs. A group of pigs from an Italian pig herd with high level of infection with *Salmonella* was included. Pigs were randomly divided into two groups: the experimental one received for 30-50 days prior to slaughter a commercial diet supplemented with formic acid source

(Formyl®), and the control pigs received the same diet but unacidified. At slaughter 100 pigs (control group) and 104 pigs (experimental group) were submitted to collection of caecal content and mesenteric lymph nodes for *Salmonella* isolation using standard procedures. The results revealed a significant decrease of the rate of carriers in the experimental group.

INTRODUZIONE

Salmonella spp. rappresenta un importante problema per l'industria suinicola. L'infezione del suino nella maggior parte dei casi decorre in maniera asintomatica e gli animali infetti si comportano come portatori sani. Mantenendo questo stato fino alla macellazione, essi rappresentano la fonte di contaminazione delle carcasse e dei prodotti da esse derivati e quindi un potenziale rischio per la salute dell'uomo.

Il Regolamento (CE) n. 2160/2003 contiene disposizioni per il controllo della *Salmonella* e di altri agenti zoonosici specifici presenti negli alimenti. Dette disposizioni impongono la fissazione di obiettivi comunitari aventi lo scopo di ridurre entro un termine prestabilito la prevalenza di *Salmonella* a livello della produzione primaria coinvolgendo anche tutte le altre fasi della catena alimentare, compresa la produzione di prodotti alimentari e mangimi. La European Food Safety Agency (EFSA) ha pubblicato nel maggio del 2008 la prima parte di un report finalizzato alla stima della prevalenza di *Salmonella* spp. nei suini destinati al macello (Anonimo 2008, Part A). Questa indagine ha messo in evidenza che nella UE al momento della macellazione, un suino su dieci (10,3%) alberga *Salmonella* spp. nei linfonodi mesenterici e in questo contesto l'Italia si classifica all'ottavo posto, con una prevalenza osservata del 16,5%. La Task Force dell'EFSA ha pubblicato di recente la parte B del report, dedicata all'analisi dei fattori di rischio relativi all'infezione da *Salmonella* nei suini da ingrasso in tutta la UE (Anonimo 2008, Part B). Da qui emerge che per ridurre la presenza di *Salmonella* nei suini e nelle loro carni è necessario mettere in atto strategie di controllo in allevamento che richiedono un approccio integrato su più fronti in considerazione della tipologia aziendale e della situazione epidemiologica interna a ciascun Paese. Ogni Paese membro dovrà a breve predisporre un Piano di Controllo Nazionale attraverso il quale raggiungere gli obiettivi di riduzione che saranno stabiliti. Sarà quindi fondamentale conoscere quali strumenti possano essere utilizzati con profitto a livello aziendale. In questo contesto abbiamo voluto valutare l'efficacia di un acido organico (Formyl®) nella fase che precede la macellazione, quale strumento complementare di riduzione della prevalenza di soggetti portatori di *Salmonella* spp. al macello.

MATERIALI E METODI

Campioni

La prova è stata condotta in un'azienda a ciclo chiuso dell'Emilia Romagna che presentava elevati valori di sieropositività per *Salmonella* spp. La scelta dell'allevamento è avvenuta in seguito a esami sierologici preliminari su un campione di 30 scrofe presenti in azienda e di 21 grassi al macello. Nei reparti di magronaggio e ingrasso al momento della prova i suini erano allevati in ciclo continuo su pavimento pieno. I suini erano alimentati con sistema di alimentazione a broda con somministrazione ad *libitum*. L'azienda utilizzava un mangime commerciale, ma formulato dal proprio formulista. I suini venivano spostati nel sito di in-

grasso a circa 60-70 Kg di peso e vi permanevano fino alla macellazione, che avviene a circa 160 Kg.

30 giorni prima della data prevista per l'invio delle prime due partite al macello è stato iniziato il trattamento. Il gruppo controllo ha ricevuto la dieta commerciale dell'azienda, mentre al gruppo trattato è stata somministrata la stessa dieta di finissaggio con l'aggiunta di 4 Kg/ton di Formyl®.

L'azienda si è impegnata a non eseguire trattamenti di massa con antibiotici durante il trattamento. In caso di terapia per via iniettiva gli animali trattati sono stati marcati ed esclusi dalla prova.

Sono state incluse nello studio 3 partite successive di trattati e di controlli che venivano inviate a macellazione settimanalmente. Di conseguenza i suini del gruppo trattato hanno assunto la dieta sperimentale per un periodo minimo di 30 e massimo di 50 giorni. Il trasporto dall'allevamento al macello è stato sempre inferiore alle 2 ore di viaggio e la sosta pre-macellazione sempre compresa fra 1 e 4 ore.

Per ogni ciclo di macellazione è stato previsto il campionamento di 30-35 suini macellati da ciascuno dei quali è stato prelevato il contenuto ciecale ed i linfonodi mesenterici facendo attenzione ad identificare i campioni delle due matrici prelevati dallo stesso animale. Complessivamente sono stati analizzati 100 campioni nel gruppo controllo e 104 campioni nel gruppo trattato. I prelievi sono stati inviati al laboratorio in contenitori refrigerati nell'arco di 2 ore dalla macellazione.

Metodiche

I test sierologici preliminari, volti a valutare il livello di siero-prevalenza sui campioni di siero prelevati da 30 scrofe e dai 21 suini grassi sono stati eseguiti utilizzando il kit Swine Salmonella Antibody Test (IDEXX) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Sono stati considerati positivi i campioni con S/P ratio $\geq 0,25$.

Per ciascun animale campionato 10 grammi di linfonodi (previa disinfezione superficiale) e 25 grammi di contenuto ciecale sono stati testati per ricerca *Salmonella spp.* secondo la metodica ISO 6579: 2002/AMD1:2007.

I ceppi di Salmonella isolati sono stati sottoposti a sierotipizzazione presso il laboratorio di batteriologia specializzata dell'IZS di Brescia. Sono stati considerati come portatori tutti i suini macellati risultati positivi almeno in uno dei due campioni (contenuto ciecale e linfonodi mesenterici) o in entrambi. Si è proceduto inoltre ad elaborare i dati considerando soltanto la contaminazione a livello di contenuto ciecale.

Analisi statistica

Le differenze tra le proporzioni osservate sono state valutate con il test X².

RISULTATI DELLA PROVA

I dati dei test sierologici preliminari hanno evidenziato una prevalenza sul campione rispettivamente del 70% nelle scrofe e dell'86% dei suini grassi. In base a questi risultati l'allevamento è stato considerato infetto con elevata prevalenza e quindi arruolato.

I dati degli esami batteriologici ottenuti dai campioni di contenuto ciecale e linfonodi mesenterici prelevati in sede di macellazione vengono presentati qui di seguito (tabella 1 e tabella 2).

Tabella 1. Risultati esame batteriologico sui campioni di feci e linfonodi mesenterici prelevati al macello, Gruppo Controllo.

Gruppo Controllo	Feci	Linfonodi	Totale positivi
1a partita	7/30 (<i>S. Typhimurium</i> 7/30)	4/30 (<i>S. Typhimurium</i> 4/30)	9/30
2a partita	17/35 (<i>S. Bredeney</i> 1/35 <i>S. Derby</i> 11/35 <i>S. Enterica</i> O:4 (B) 2/35 <i>S. Soerenga</i> 1/35 <i>S. Typhimurium</i> 2/35)	0/35	17/35
3a partita	17/35 (<i>S. Rissen</i> 9/35 <i>S. Derby</i> 5/35 <i>S. Typhimurium</i> 3/35)	0/35	17/35
Totale	41/100 (41,00%)		43/100 (43,00%)

Tabella 2. Risultati esame batteriologico sui campioni di feci e linfonodi mesenterici prelevati al macello, Gruppo Trattati.

Gruppo Trattati	Feci	Linfonodi	Totale positivi
1° prelievo	6/35 (<i>S. Panama</i> 5/35 <i>S. Typhimurium</i> 1/35)	1/35 (<i>S. Typhimurium</i> 1/35)	6/35
2° prelievo	8/34 (<i>S. Brandenburg</i> 1/34 <i>S. Enterica</i> 4,12:i:- 2/34 <i>S. Hadar</i> 2/34 <i>S. Typhimurium</i> 3/34)	5/34 (<i>S. Enterica</i> 4,12:i:- 2/34 <i>S. Rissen</i> 1/34 <i>S. Typhimurium</i> 2/34)	11/34
3° prelievo	11/35 (<i>S. Derby</i> 5/35 <i>S. Enterica</i> 4,12:i:- 1/35 <i>S. Typhimurium</i> 5/35)	4/35 (<i>S. Derby</i> 1/35 <i>S. Typhimurium</i> 3/35)	13/35
Totale	25/104 (24,04%)		30/104 (28,85%)

Per il gruppo di controllo (tabella 1) sono stati analizzati 100 campioni di feci ed altrettanti linfonodi ed i campioni positivi sono risultati essere 43, ossia il 43,00%. Nel gruppo trattato (tabella 2) invece sono stati esaminati 104 campioni, di cui 30 positivi (28,85%).

La differenza osservata tra le proporzioni di positivi nei gruppi, pari a 14,15% [IC95%: 1,11% – 27,19%], è risultata essere statisticamente significativa (test X², p<0,05). Il rischio relativo tra il gruppo dei controlli e il gruppo trattato è risultato pari a 1,5 (43,00/28,85).

Analizzando i dati ottenuti dalla contaminazione delle sole feci (tab. 1 e 2, prima colonna), si osserva una maggiore differenza tra i gruppi, pari a 16,96% [IC95%: 4,29% – 29,63%]. Tale differenza è determinata dalla presenza di 41 campioni positivi su 100 nel gruppo di controllo (41,00%) e di 25 campioni positivi su 104 nel gruppo trattato (24,04%).

Anche in questo caso la differenza è risultata statisticamente significativa (test X², p<0,01); il rischio relativo è risultato pari a 1,7 (41,00/24,04).

DISCUSSIONE

Uno dei punti chiave per ridurre la contaminazione delle carcasse da parte di *Salmonella* è assicurarsi che la prevalenza di suini portatori sia compresa entro limiti accettabili. Diversi ricercatori hanno evidenziato che la circolazione di *Salmonella* risulta piuttosto frequente nelle fasi finali dell'allevamento del suino leggero (Berends et al., 1996; Davies et al., 1999, Funk et al., 2001, Creus et al. 2007). Dati ottenuti da Merialdi et al. (2007) e da Nigrelli et al. (2008) confermano queste osservazioni anche per quanto riguarda il suino pesante italiano ed anzi suggeriscono che proprio la maggiore durata del periodo di ingrasso potrebbe configurarsi come uno dei punti critici nel controllo dell'infezione in allevamento: interventi mirati in questa fase potrebbero essere utili per ridurre il numero di suini portatori al momento della macellazione. Nella maggior parte delle osservazioni condotte e riportate in bibliografia l'aggiunta di acidi organici alla dieta o all'acqua di bevanda per periodi prolungati a partire da diverse settimane prima della macellazione è risultata efficace nel prevenire la colonizzazione dell'intestino da parte dei batteri patogeni (Øverland et al., 2000; Jensen et al., 2003) e nel ridurre la sieroprevalenza dell'infezione da *Salmonella* (Van der Heijden et al., 2006; Van der Wolf et al.; 2001, Creus et al., 2007; Visscher et al. 2008). Altri Autori (De Busser et al., 2007; De Busser et al., 2008), utilizzando acidificanti per periodi più brevi non hanno invece ottenuto risultati incoraggianti. In questo studio, con una somministrazione della durata di almeno 30 giorni, sono state osservate differenze statisticamente significative tra i dati ottenuti dai campioni fecali e linfonodali prelevati dal gruppo controllo e da quello trattato. Una maggiore riduzione della prevalenza è stata successivamente rilevata considerando soltanto i risultati sui contenuti ciecali, dove si è passati da una positività del 41% nel gruppo controllo, ad una del 24% in quello trattato e questo fatto potrebbe essere riconducibile ad un effetto più marcato del prodotto all'interno del lume intestinale che non a livello linfonodale.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questa prova di campo hanno messo in evidenza che l'aggiunta di acidificanti protetti (Formyl®) alla dieta per un periodo di almeno 30 giorni prima della macellazione può essere considerato uno strumento di valido ausilio per ridurre la

prevalenza dell'infezione da *Salmonella* spp. E' tuttavia doveroso sottolineare che per ottenere risultati ripetibili e costanti nel ridurre la prevalenza dell'infezione in allevamento non è mai sufficiente applicare una singola misura ma è invece necessario implementare una combinazione di interventi di tipo gestionale, sanitario ed alimentare. Il problema richiede quindi un intervento simultaneo su più fronti ed il modo migliore per il Veterinario di approcciarsi ad esso è sicuramente quello di elaborare strategie adeguate a partire dall'individuazione di tutti i punti critici presenti in allevamento, così da avere bene chiara la tipologia aziendale con la quale ha a che fare e la sua situazione epidemiologica.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i colleghi Giovanni Vecchi, Giorgio Cuoghi, Oliviero Bossoli ed Eros Moscardini per il supporto logistico e tutto il personale tecnico della Sezione IZSLER di Bologna per l'insostituibile contributo tecnico.

Bibliografia

- Anonimo (May, 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, 20006-2007. Part A. The EFSA Journal 135, 1-111.
- Anonimo (November, 2008) "Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 20006-2007. Part B. The EFSA Journal 206, 1-111
- Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. van Knapen (1996) "Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs". Int. J. Food Microbiol. 30, 37-53.
- Creus E., Pérez J.F., Peralta B., Baucells F., Mateu E. (2007) "Effect of Acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs". Zoonoses and Public Health 54, 314-319.
- Davies, P. R., J. A. Funk, and W. E. M. Morrow (1999) "Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina". Swine Health Prod. 7, 231-234.
- De Busser E.V., Dewulf J., Nollet N., Houf K., Schwarzer K., De Sadeleer L., De Zutter L., Maes D. (2008) "Effect of the use of organic acids in drinking water during the last two weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding". In: 7th International Symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork, Verona, 9-11 May 2007, 280-282.
- De Busser E.V., Dewulf J., Nollet N., Houf K., Schwarzer K., De Sadeleer L., De Zutter L., Maes D. (2007) "Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses". Zoonoses and Public Health, 1-7.
- De Busser E.V., Dewulf J., Nollet N., Houf K., Schwarzer K., De Sadeleer L., De Zutter L., Maes D. (2008) "Effect of the use of organic acids in drinking water before slaughter on *Salmonella* shedding". In: Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, 178.
- Funk, J. A., P. R. Davies, and M. A. Nichols, 2001) "Longitudinal study of *Salmonella*

- enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems". *Vet. Microbiol.* **83**, 45–60.
- Jensen, B. B., O. Hojberg, L. L. Mikkelsen, S. Hedeman, N. Canibe, (2003) "Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease". In: Ronald O. Ball: (ed.), *Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, AB, Canada, pp. 103–119. University of Alberta, Banff, AB, Canada.
- Meriardi G., Tittarelli C., Bonilauri P., Dottori M., Bonci M., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Granito G., Guerzoni S. (2007) "Studio longitudinale dell'infezione da *Salmonella* in quattro allevamenti a ciclo chiuso del Nord Italia". In: XXXIII Meeting Annuale SIPAS, Modena, Marzo 2007, 445-455.
- Nigrelli A.D., Alborali L., Boldini M., Fabbri M., Vezzoli F. (2008) "prevalenza dell'infezione da *Salmonella* enterica in allevamenti del Nord Italia: modello di distribuzione in fasce a differente prevalenza". In: XXXIV Meeting Annuale SIPAS, Salsomaggiore Terme, Marzo 2008, 195-200.
- Øverland M., Granli T., Kjos N.P., Fjetland O., Steien S.H., Stokstad M. (2000) "Effect of dietary formats on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs". *J. Anim. Sci.* **78**, 1875-1884.
- Van der Heijden H.M.J.F., Ederveen W., Niewerth D., Frankena K. (2006) "Effectiveness and profitability of different *Salmonella* control programmes in a large field trial". *The Pig J.*, **58**, 182-189.
- Van der Wolf P.J., van Shie F.W., Elbers A.R.W., Engel B., van der Heijden H.M.J.F., Hunnemann W.A., Tielen M.J.M. (2001) "Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections". *Vet. Quart.* **23**, 121-125.
- Visscher C.F., Winter P., Verspohl J., Stratmann-Selke J., Upmann M., Beyerbach M., Kamphues J. (2008) "Effects of feed particle size at dietary presence of added organic acids on caecal parameters and the prevalence of *Salmonella* in fattening pigs on farm and at slaughter". *J. of Anim. Phys. and Anim. Nutrit.* 1-8.