

VERIFICA DELLA PRESENZA DI ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN SUINI REGOLARMENTE MACELLATI IN FRIULI VENEZIA GIULIA E PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO

PRESENCE OF ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN SLAUGHTERED SWINE IN FRIULI VENEZIA GIULIA REGIONE AND BOLZANO PROVINCE

USTULIN M., COLORIO S., TARGHETTA C., FERINO L., IDRIZI I., LA SPISA M., VIO D.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: Mal rosso, suino, MIC

Keywords: erysipelas, swine, MIC

RIASSUNTO

Erysipelotrix rhusiopathiae (ER) l'agente eziologico del Mal Rosso del suino, può infettare anche altre specie animali causando tra le altre, forme setticemiche. Inoltre è un agente di zoonosi che interessa categorie professionali collegate ai suini ed alla suinicoltura in generale.

Nel suino la malattia è controllata tramite la vaccinazione nei riproduttori e la terapia antibiotica di eventuali forme cliniche; i soggetti con forme evidenti di Mal Rosso sono esclusi dalla macellazione e le relative carcasse, come previsto dalla normativa, destinate alla distruzione. È tuttavia possibile che soggetti con forme inapparenti che albergano il patogeno a livello di tonsille, intestino o cute, arrivino alla macellazione.

A seguito di un monitoraggio su soggetti macellati si è evidenziata una percentuale di soggetti positivi alle analisi biomolecolari del 16,04% in Friuli Venezia Giulia e del 46,2% Nella Provincia Autonoma di Bolzano.

Da 20 soggetti positivi in PCR sono stati isolati ceppi di ER che sono stati sottoposti a determinazione della MIC e dello Spa-Type, evidenziando una netta prevalenza di SpaA e di ceppi sensibili alle penicilline, terapia solitamente utilizzata per la cura del Mal Rosso.

ABSTRACT

Erysipelotrix rhusiopathiae (ER) is the aetiological agent of swine erysipelas, but it can cause diseases in other animal species and erysipeloid in human, too.

The clinical pathology is usually kept under control by vaccination of sows and antibiotic therapy in clinical cases. Anyway, it is possible that animals without symptoms but hosting ER on tonsils, intestines or skin can be regularly slaughtered.

A monitoring at slaughterhouse showed positivity by PCR in 16,04% of swine slaughtered in Friuli Venezia Giulia Region and in 46,2% of swine slaughtered in Bolzano Province.

On samples collected from 20 animals ER strains were isolated and furthered characterized. Spa type determination showed clear prevalence of SpaA type and MIC determination showed that sensitivity to penicillin and ampicillin is still common.

INTRODUZIONE

Erysipelotrix rhusiopathiae (ER) è un germe ubiquitario, capace di infettare numerose specie animali e l'uomo. Il serbatoio più importante è rappresentato dai suini. Negli

allevamenti di suini è presente a livello ambientale (feci, liquami, acqua di derivazione e scolo) e può essere isolato da feci e tonsille di animali portatori.

L'infezione nel maiale causa il Mal Rosso o Mal Rossino, malattia infettiva a decorso solitamente acuto che si manifesta in una forma setticemica con ipertermia, iperemia cutanea e splenomegalia; può inoltre provocare l'aborto nelle scrofe gravide. Nella fase acuta e nella forma subacuta dell'infezione è presente anche una forma esantematica con la comparsa di chiazze ben delimitate (esantema a mattone "diamond shaped") sui fianchi e sul dorso degli animali colpiti. In forma cronica è causa di endocarditi, per lo più vegetative, e artrosinoviti. Le scrofe vengono regolarmente vaccinate per ER per limitare le forme abortigene; la vaccinazione non è invece applicata ai suini da ingrasso, che possono essere così interessati da forme acute e subacute. Per il trattamento di eventuali forme cliniche si ricorre in questi casi alla terapia antimicrobica (Opriessning *et al.*, 2012). L'infezione da ER nell'uomo causa l'erisipeloide, patologia cutanea (cellulite localizzata) che può sfociare in forme endocardiche e artritiche e più raramente in forme setticemiche acute. La maggior parte dei casi di erisipela nell'uomo è epidemiologicamente legata al suino; le categorie professionali più esposte al rischio sono gli operatori degli stabilimenti di macellazione e di lavorazione delle carni, seguiti dagli operatori delle aziende suinicole. I suini con forme cliniche evidenti sono esclusi dalla macellazione; soggetti con forme inapparenti, regolarmente macellati, albergano l'agente a livello di tonsille, intestino e cute. La trasmissione dell'infezione all'uomo avviene tramite soluzioni di continuo della cute o per via alimentare ((Brooke e Riley, 1999).

Nel suino, la diagnosi delle forme cliniche conclamate è affidata all'isolamento batteriologico di ER da campioni di organo, metodica robusta in ragione delle alte cariche batteriche nelle forme setticemiche; per l'isolamento nelle forme croniche o inapparenti è necessario il ricorso a terreni di arricchimento in ragione della bassa carica batterica nel campione.

I dati di prevalenza dell'infezione inapparente nei suini macellati in Italia sono pressoché assenti o limitati a studi eseguiti su un numero limitato di campioni; non sono disponibili dati di tipizzazione molecolare dei ceppi isolati né dati relativi all'antimicrobicoresistenza (AMR) di ER.

Lo scopo del monitoraggio è stato quello di verificare la prevalenza di suini portatori sani di ER tra quelli regolarmente macellati in Friuli Venezia Giulia (FVG) e Provincia Autonoma di Bolzano.

MATERIALI E METODI

Il protocollo di campionamento è stato stabilito al fine di stimare la prevalenza di malattia al macello e ha previsto la raccolta di campioni di cute (tramite spongebag), feci e tonsille campionando 7 animali a settimana per 16 settimane. I campionamenti sono stati suddivisi tra due macelli in FVG e altrettanti nella Provincia Autonoma di Bolzano.

Per ciascun campione è stata prevista una prima fase di prearricchimento tramite semina Tryptone Soy Broth (TSB) e incubazione a 37°C per 18-24 ore. Da un'aliquota di prearricchito è stato estratto il DNA utilizzando il kit MagMax Core sull'estrattore automatico King Fisher Flex. Gli estratti sono stati sottoposti a screening secondo la metodica Real Time PCR descritta da Pal *et al.* (2009) che prevede l'utilizzo di primer comuni alle specie di *Erysipelothrix* spp. e una sonda specifica per ER che garantisce elevata specificità.

Dai campioni risultati positivi all'analisi biomolecolare sono proseguite le indagini microbiologiche per tentare l'isolamento del microrganismo.

Il protocollo di isolamento associa l'uso di terreni selettivi e non selettivi e di diverse

condizioni di incubazione, per aumentare le probabilità di isolamento dei ceppi di ER. Nello specifico, si è proceduto a inoculare 1 ml brodo di prearricchimento in 9 ml di brodo selettivo, TSB addizionato con Kanamicina e Gentamicina (TSB+K+G) e, al tempo stesso, a seminare lo stesso prearricchito su due piastre di Agar Sangue (AS). Il TSB+K+G e una delle piastre di AS sono stati incubati a 37°C per 24 ore in aerobiosi, la seconda piastra di AS in microaerofilia (5% di CO₂).

Dopo 24 ore di incubazione, si è proceduto a inoculare 100 µl di TSB+K+G su due piastre di AS e altrettanti su due piastre di Tryptone Soy Agar addizionato con Kanamicina e Gentamicina (TSA+K+G). Di ciascun terreno una piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore in microaerofilia e una in aerobiosi (Colavita *et al.*, 2006).

Tutte le piastre di AS e TSA+K+G sono state lette dopo 24 e 48 ore di incubazione per verificare la presenza di colonie con morfologia riferibile a ER. Da eventuali colonie sospette si è proseguito con isolamento e identificazione.

I ceppi isolati sono stati poi sottoposti a determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) e dello Spa-type.

La MIC è stata determinata con metodo della microdiluizione in brodo, con l'aggiunta di un indicatore di pH, il Rosso Fenolo allo 0,2%, per facilitare la lettura delle micropiastre. Lo Spa-type è stato determinato tramite real time PCR effettuato sul DNA del ceppo batterico (Shen *et al.* 2010).

RISULTATI

Per la Regione FVG sono stati analizzati campioni di 106 suini, di cui 17 sono risultati positivi per almeno una delle matrici prelevate ovvero 16,04%.

Nel dettaglio, sono risultate positive le tonsille di 11 animali, la cute di 10 animali e un solo campione di feci. 3 soggetti sono risultati positivi su 2 matrici e 1 su 3. Da nessuno dei campioni analizzati è stato isolato un ceppo di ER.

Per la Provincia Autonoma di Bolzano sono stati analizzati campioni di 104 suini di cui 48 sono risultati positivi per almeno una delle matrici prelevate per una prevalenza ovvero il 46,2%.

Nel dettaglio, sono risultate positive le tonsille di 40 animali, la cute di 27 animali e 13 campioni di feci. 16 soggetti sono risultati positivi su 2 matrici e 8 su 3.

Nessun ceppo di ER è stato isolato dai campioni prelevati in FVG, mentre sono stati isolati 20 ceppi provenienti da animali macellati a Bolzano.

I ceppi sono stati ulteriormente caratterizzati andando a determinare lo Spa-type. 19 ceppi sono stati identificati come SpaA, il sottotipo più frequente, mentre l'ultimo è rimasto indeterminato.

13 ceppi sono stati sottoposti a determinazione della MIC, i risultati sono riassunti in tabella 1.

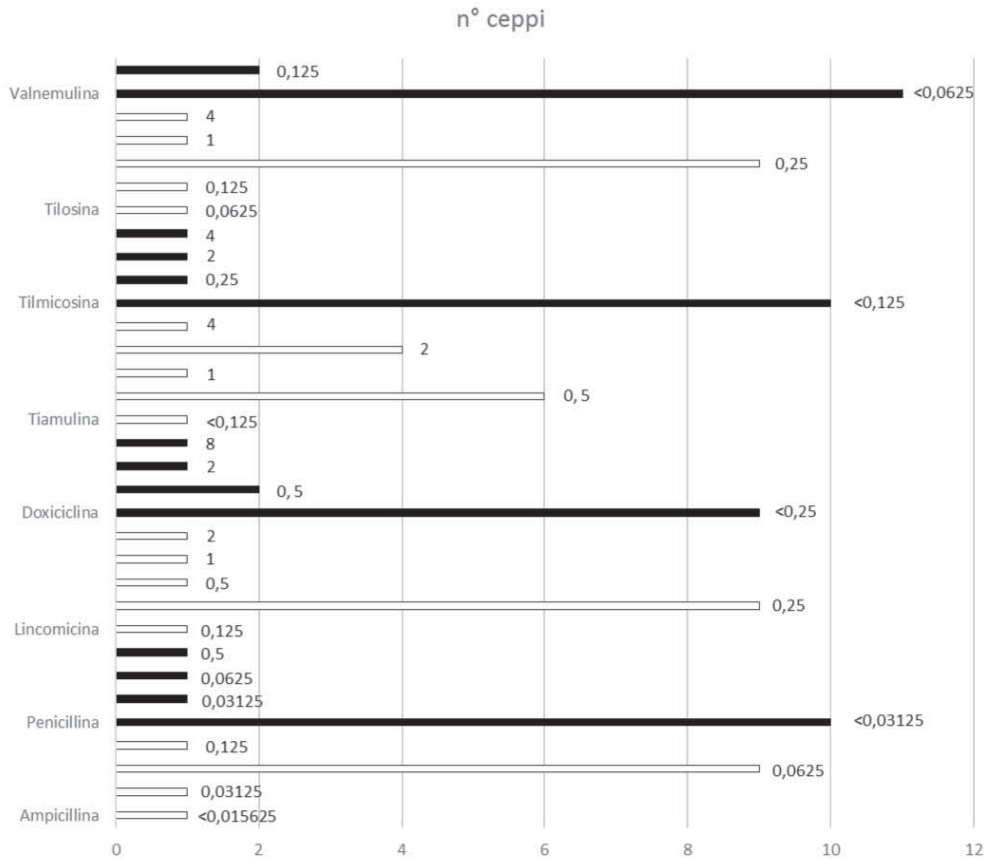


Tabella 1: Esiti MIC
Table 1: MIC results

DISCUSSIONE

I risultati del presente monitoraggio hanno evidenziato una percentuale modesta di portatori sani in FVG ed una più consistente in provincia di Bolzano. I fattori che possono influenzare la prevalenza di questo microrganismo sono numerosi e includono caratteristiche degli allevamenti e di management che andranno approfondite. È però già noto che il sistema di allevamento in FVG include allevamenti di dimensioni maggiori rispetto a quelli presenti nel territorio della Provincia Autonoma di Bolzano, dove l'allevamento del suino è distribuito in allevamenti di piccole dimensioni votati prevalentemente al consumo familiare oppure alla produzione di salumi consumati localmente.

Un dato interessante è che la quasi totalità dei ceppi isolati presenta come antigene di superficie lo SpaA. Gli antigeni protettivi di superficie (spa) di *Erysipelothrix spp* sono associati alla virulenza del ceppo e determinano risposta anticorpale in corso di infezione (Ingebritson *et al.*, 2010). Dati sperimentali di immunizzazione su topi, hanno evidenziato protezione completa verso ceppi con spa-type omologo e parziale verso ceppi con diverso spa-type.

SpaA è la proteina di superficie prodotta dai sierotipi 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17 ed N,

SpaB viene prodotta dai sierotipi 4, 6, 11, 19 e 21 mentre SpaC viene prodotta da sierotipo 18 (McNeal *et al.*, 2017).

Considerato che i vaccini disponibili in commercio sono prodotti con ceppi di sierotipi 1 e/o 2, la prevalenza netta di ceppi dello stesso spa-type può essere considerata suggestiva di una buona efficacia dei vaccini disponibili sui ceppi circolanti, considerato anche il fatto che nessuno di questi ceppi sia stato isolato da animali sintomatici.

Per quanto concerne i profili di AMR, sulla base Break point (BP) descritti nel CLSIVET06, possiamo stabilire che 12 su 13 ceppi sono risultati sensibili alla penicillina ($BP S \leq 0,12$) e 13 ceppi su 13 ad ampicillina ($BP S \leq 0,25$). Nei casi clinici di Mal Rosso le penicilline sono i farmaci di elezione, per cui abbiamo potuto verificare diffusa sensibilità tra i ceppi circolanti.

Non essendo disponibili i BP specifici per lincomicina, sono stati utilizzati i BP per la clindamicina ($BP S \leq 0,25$; $I=0,5$; $R \geq 1$), farmaco appartenente alla stessa famiglia (lincosamidi). Sulla base di tali BP possiamo classificare 10 ceppi sensibili come “sensibili”, 1 come “intermedio” e 2 come “resistenti”.

Come considerazione generale, il fatto che per la maggior parte dei principi attivi analizzati presentino valori di MIC inferiori alla più bassa concentrazione testata è da considerarsi favorevole in merito alla sensibilità dei ceppi isolati verso le principali molecole antimicrobiche anche in assenza di BP ufficiali.

CONCLUSIONI

Nonostante la patologia clinica sia un evento poco comune e la vaccinazione, in particolare nelle scrofe, un intervento di routine, la presenza di animali portatori sani non va trascurata, soprattutto in funzione del fatto che ER sia un agente di zoonosi.

Attenzione va posta anche al fatto che la generale riduzione dell'utilizzo di antimicrobici a scopo metafilattico negli allevamenti potrebbe favorire la diffusione di questo batterio.

Le attività descritte sono state svolte nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 17/18 “Approccio diagnostico integrato per la ricerca, caratterizzazione biomolecolare e la determinazione del profilo di antibioticoresistenza di *Erysipelothrix rhusiopathiae* in suini regolarmente macellati nel Nord-est italiano” finanziata dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

1. Brooke C.J., Riley T.V., *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* 1999 Sep;48(9):789-799. doi: 10.1099/00222615-48-9-789
2. CLSI VET 06, Methods for Antimicrobial susceptibility testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals. 1st Edition
3. Colavita, G., Vergara, A., & Ianieri, A. (2006). Deferment of slaughtering in swine affected by cutaneous erysipelas. *Meat Sci.*, 72(2), 203–205.
4. Ingebritson A. L , Roth J. A, Hauer . *Erysipelothrix rhusiopathiae*: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. *Vaccine* 2010 Mar 16;28(13):2490-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.041. Epub 2010 Jan 29.
5. McNeil, M., Gerber, P.F., Thomson, J., Williamson S., Opriessnig T. (2017). Serotypes and Spa types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from British pigs (1987 to 2015). *The Veterinary Journal*, 225, 13-15.
6. Opriessnig, T., & Wood, R. L. (2012). Erysipelas. In G. W. S. Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz (Ed.), *Disease of swine* (10 th, pp. 750–759). John Wiley & Sons.

7. Shen H.G., J.S. Bender and T. Opriessnig (2010) Identification of surface protective antigen (spa) types in *Erysipelothrix* reference strains and diagnostic samples by spa multiplex real-time and conventional PCR assays. *Journal of Applied Microbiology*, 109 1227–1233
8. N. Pal, J.S. Bender and T. Opriessnig. Rapid detection and differentiation of *Erysipelothrix* spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04560.x