

DINAMICA DELL'INFEZIONE DA BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DA INGRASSO ENDEMICAMENTE INFETTO

MASSACCI F.R.^[1], CUCCO L.^[1], DE LUCA S.^[1], FELICI C.^[2], SEBASTIANI C.^[1],
TENTELLINI M.^[1], MAGISTRALI C.F.^[1]

^[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) ~ Perugia ~ Italy,*

^[2]*Libero Professionista ~ Norcia ~ Italy*

Keywords: *Brachyspira hyodysenteriae*, shedding, clustering

Riassunto

Il batterio anaerobio *Brachyspira hyodysenteriae* è l'agente eziologico della dissenteria suina (SD); malattia descritta da quasi un secolo ma per la quale mancano ancora dati relativi alla trasmissione in allevamento, fondamentali per impostare sistemi di controllo.

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare le modalità di escrezione in un allevamento da ingrasso endemicamente infetto, in presenza ed in assenza di diarrea, ed effettuare un confronto tra le due metodiche, batteriologico e PCR real-time.

B. hyodysenteriae è stata isolata dagli animali a partire dai 4 mesi circa di vita, mostrando un profilo multiresistente. La correlazione effettuata tra esame colturale e PCR real-time è risultata buona.

L'infezione non si è limitata ad un periodo circoscritto, ma ha interessato tutta la durata del ciclo, a dispetto dei trattamenti antimicrobici. Lo stesso animale poteva eliminare *B. hyodysenteriae* in modo continuativo fino ad un massimo di sei settimane; inoltre, alcuni soggetti hanno eliminato il batterio in momenti diversi, anche a distanza di 10 settimane, con o senza diarrea. Infine, l'infezione si è diffusa lentamente in allevamento, interessando i singoli box in momenti diversi, dimostrandone la marcata clusterizzazione.

I dati confermano la necessità di individuare misure di controllo della SD non basate sul trattamento antimicrobico, in un contesto di crescente pressione per la riduzione dell'impiego di antibiotici in suinicoltura.

Abstract

Brachyspira hyodysenteriae is the etiological agent of swine dysentery (SD), an enteric disease which has been known about for almost a century, but there are few studies on the epidemiology of *B. hyodysenteriae* infection in swine herds, fundamental for setting up control systems. The focus of this study was to investigate the spread of *B. hyodysenteriae* in an endemically infected finishing herd with and without diarrhoea and to compare the two techniques, bacteriological and real-time PCR.

B. hyodysenteriae was isolated from animals four months old, with a multi-drug resistant profile. The correlation between the results from bacterial culture and real-time PCR in the finishing samples was rather good. The infection was not limited to a specific period, but affected the entire finishing cycle, in spite of antimicrobial treatments. The same animal was able to eliminate *B. hyodysenteriae* continuously up to a maximum of six weeks; in addition, some pigs eliminated the bacteria at different times, even after 10 weeks, with or without diarrhoea. Finally, the infection spread slowly in the herd, in the different boxes at different times, showing marked clustering.

The data confirm the necessity to find systems of SD control not based on antimicrobial treatment, in a context of increasing pressure to reduce the use of antibiotics in pig farming.

INTRODUZIONE:

La dissenteria suina (Swine Dysentery, SD), di cui è responsabile il batterio *Brachyspira hyodysenteriae*, è una malattia enterica infettiva trasmissibile che si manifesta prevalentemente nelle fasi di magronaggio ed ingrasso. Clinicamente, la patologia si manifesta attraverso una diarrea muco-emorragica, con prevalenza e gravità variabile: la morbilità può raggiungere il 75%, mentre la mortalità si attesta generalmente tra il 5 e il 25% (1). L'infezione è generalmente introdotta negli allevamenti attraverso soggetti asintomatici e all'interno delle aziende tende a permanere in modo endemico, con frequenti recidive. Il contagio tra individui avviene in maniera diretta mediante le feci infette; la malattia si manifesta di norma dopo 10-14 giorni dal contatto (2). Nella fase acuta il soggetto può eliminare fino a 108-109 cellule batteriche per ogni grammo di feci; il patogeno può essere individuato nel materiale fecale per un periodo anche di 70 giorni dopo la scomparsa dei sintomi (2). Si assiste, perciò, ad un'evidente alterazione dei parametri produttivi, con riduzione del tasso di crescita e della efficienza della conversione alimentare, ai quali si devono aggiungere gli eventuali costi terapeutici. La dissenteria suina è quindi considerata una malattia dall'impatto economico rilevante (3).

L'individuazione della infezione nei suini è particolarmente problematica. La sintomatologia si può facilmente confondere con quella derivante da altre patologie; inoltre, in alcuni individui essa non risulta apprezzabile per effetto di altri fattori, quali la parziale efficacia di trattamenti precedenti e l'assunzione di diete in grado di contrastare i sintomi (4).

Nonostante la SD sia una malattia descritta da quasi un secolo, gli studi relativi all'epidemiologia della infezione da *B. hyodysenteriae* negli allevamenti suini sono scarsi (5). Pertanto risulta utile approfondire le conoscenze sulla diffusione e la trasmissione del patogeno negli allevamenti.

Scopo del presente lavoro, dunque, è stato quello di verificare le modalità di escrezione di *B. hyodysenteriae* in condizioni di campo in suini da ingrasso in presenza ed in assenza di diarrea, appartenenti ad un allevamento endemicamente infetto. Gli animali sono stati esaminati tramite metodiche tradizionali (valutazione della sostanza secca fecale ed esame colturale) e in PCR real-time, allo scopo di quantificare l'escrezione del patogeno nel corso di un naturale focolaio di dissenteria suina.

MATERIALI E METODI:

Campionamento

È stato effettuato uno studio di coorte in una azienda di suini da ingrasso dell'Italia centrale, con un'anamnesi positiva per SD negli anni precedenti. Nell'allevamento, sono stati registrati i dati relativi alla somministrazione di antimicrobici agli animali. La settimana precedente l'inizio della sperimentazione, sono stati effettuati tamponi ambientali ed esaminati i roditori catturati in azienda. Gli animali, 50 soggetti distribuiti in due capannoni, sono stati identificati singolarmente, e sottoposti a prelievo all'ingresso in azienda. Con cadenza settimanale, è stata effettuata una osservazione clinica dei suini, per registrare l'eventuale presenza di diarrea. Successivamente, è stato effettuato un campionamento di feci o tampone rettale, su base individuale. Tutti i campioni, mantenuti a temperatura di refrigerazione e conferiti al laboratorio entro 4 ore, sono stati sottoposti a test batteriologico selettivo per la ricerca di *Brachyspira* spp. e alla valutazione della sostanza secca fecale. Nel caso l'animale presentasse diarrea, i campioni sono stati sottoposti ad esame batteriologico per escludere la presenza di ETEC e *Salmonella* spp. e a PCR nested per escludere la presenza di *Lawsonia intracellularis*. Un'aliquota è stata conservata a -20°C per l'esecuzione della PCR real-time.

Stima della sostanza secca fecale

È stata effettuata mediante tecnica di essiccamento a microonde, come descritto da Pedersen (6).

Il calcolo della sostanza secca fecale è stato effettuato secondo la seguente formula:

$SS\% = (\text{peso finale} - \text{tara}) / \text{peso feci iniziale} \times 100$.

I dati relativi alla sostanza secca fecale sono stati suddivisi in quattro categorie, sulla base dei valori di cut-off indicati da Pedersen (6).

Esame colturale selettivo per *Brachyspira* spp.

L'esame colturale è stato effettuato come altrove descritto (7). In breve, è stata effettuata una semina del materiale fecale in TSA-BJ medium, seguita da incubazione a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 5 giorni. Le colture sono state identificate come sospette basandosi sulla presenza di emolisi e sull'esito dell'esame microscopico.

Le colonie provenienti dalle piastre positive sono state, quindi, sottoposte ad estrazione del DNA mediante bollitura, seguita da PCR end-point secondo il protocollo descritto da La (8).

Esame colturale per la ricerca di ETEC e *Salmonella* spp.

È stato effettuato un esame batteriologico dalle feci utilizzando due terreni Agar sangue (AS) e McConkey Agar (MC), seguito da un'incubazione di 37°C per 24-48 ore. Al termine di questo periodo è stata valutata crescita e la morfologia delle colonie batteriche. Successivamente, le colonie sospette per *E. coli* e *Salmonella* spp. su base morfologica e con riferimento alla produzione di lattosio sono state isolate, annotando l'eventuale presenza di emolisi. Le colonie sono state quindi sottoposte a conferma biochimica (API Rapid 20E, Bio-Merieux). Infine, è stata effettuata una ricerca dei geni codificanti per i principali fattori di virulenza per i ceppi di *E. coli* tramite PCR (9).

PCR per *Lawsonia intracellularis*

Sono stati sottoposti a PCR nested per la ricerca di *L. intracellularis* i campioni di feci diarroiche seguendo la metodica descritta da Jones (10).

Test della Minima Concentrazione Inibente

Isolati positivi per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* sono stati sottoposti al test della Minima Concentrazione Inibente (MIC) sulla base di quanto già descritto da Rohde (11). I breakpoint clinici per l'interpretazione dei dati di MIC per *B. hyodysenteriae* sono stati proposti da Ronne e Szancer (12).

PCR real-time

Sono stati esaminati 244 campioni fecali selezionandoli da diversi animali e da diversi stadi di infezione. I DNA estratti dalle feci sono stati analizzati tramite PCR real-time multiplex come descritto da Willems nel 2010 (13). I primer e le sonde utilizzate sono dirette all'amplificazione del gene *nox* per *Brachyspira* spp. e del gene *aspA* per *L. intracellularis*. La reazione e l'analisi quantitativa sono state condotte sulla base di quanto già descritto (14). Le reazioni sono state eseguite utilizzando la piattaforma FAST 7500 HT Sequence Detection System (Life Technologies).

Analisi statistica

È stata valutata la concordanza tra PCR real-time ed esame colturale per *B. hyodysenteriae* utilizzando il test K di Cohen.

RISULTATI E DISCUSSIONE:

I tamponi ambientali effettuati prima dell'ingresso dei suini in allevamento sono risultati negativi. Nel corso del lavoro, sono stati effettuati 50 campioni in 21 giornate diverse. Trentadue suini nella coorte hanno eliminato *B. hyodysenteriae* almeno una volta nel corso dell'indagine. Tuttavia questo numero potrebbe essere sottodimensionato, perché 21 animali non sono stati seguiti fino al termine dell'indagine, principalmente per la perdita dell'ear tag a partire dal quindicesimo prelievo.

Per quanto riguarda la presenza di altri patogeni nelle feci diarroiche, durante il lavoro nessun campione è risultato positivo per *Salmonella* spp. Al contrario, nelle prime fasi del campionamento (suini fino ai 3 mesi di età), 10 campioni sono risultati positivi per *E. coli* emolitico, di cui uno solo positivo anche a *B. hyodysenteriae*. Gli animali campionati erano stati sottoposti a diversi trattamenti antimicrobici durante la loro carriera produttiva. A 3 mesi gli è stata somministrata tiamulina per 10 gg (160 ppm), a 4 mesi di età tilosina per 5gg (200 ppm), a 5 mesi aivlosina per 7 gg (63,75 ppm) e nuovamente tiamulina a 6 mesi per 10 gg (160 ppm) e a 7 per 20 gg (80 ppm). I dati relativi alla categorizzazione delle feci e all'esito dell'esame colturale sono indicati in tabella 1, mentre in griglia 1 sono mostrati i risultati dei campionamenti effettuati nel corso dell'indagine, suddivisi individualmente e per box.

La correlazione effettuata tra esame batteriologico e PCR real-time a partire dai campioni provenienti dall'ingrasso, è risultata buona, collocandosi a un valore di 0,758 (I.C. 95% 0.627-0.889), che è considerato nella scala di Altman un accordo buono. La PCR real-time ha permesso di evidenziare costantemente un numero di suini escretori più elevato, anche se non può essere ancora identificata come uno strumento per escludere la presenza di portatori, anche a motivo del suo costo elevato.

Dall'esame generale dei risultati emerge innanzitutto la lunga durata dell'escrezione batterica: il primo animale escretore è stato infatti rilevato a distanza di due mesi circa dall'introduzione in azienda, e l'escrezione è proseguita ininterrottamente nella coorte fino al termine del ciclo produttivo. Non solo, anche la presenza di diarrea associata ad infezione si è mantenuta per tutta la durata del lavoro. Non abbiamo potuto infatti osservare una maggiore suscettibilità alla infezione alla malattia in suini di una età definita. Lo stesso animale poteva eliminare *B. hyodysenteriae* con le feci in modo continuativo fino ad un massimo di sei settimane. Inoltre, si sono osservati casi di animali che hanno eliminato *B. hyodysenteriae* in momenti diversi, anche a distanza di dieci settimane uno dall'altro. La presenza di diarrea associata ad escrezione si è osservata per un massimo di due prelievi consecutivi, ma in alcuni casi si è registrata nello stesso animale a distanza anche di dieci settimane. Questi dati sottolineano la mancata correlazione tra la SD e una precisa fascia di età, a differenza di quanto si osserva per altre infezioni che colpiscono i suini da ingrasso, confermando quanto descritto da Patterson (5). La correlazione all'esame colturale tra la presenza di *B. hyodysenteriae* e la valutazione della sostanza secca fecale di categoria 3 e 4 (suini sintomatici) è stata di circa il 30%; nel 70% dei casi si è osservata una escrezione di *B. hyodysenteriae* senza la presenza di diarrea.

Un aspetto che accomuna l'andamento della infezione nell'allevamento all'ingrasso e nelle riproduttrici (14) è la presenza di una clusterizzazione spaziale della infezione; infatti, animali appartenenti allo stesso box e nello stesso capannone hanno mostrato escrezione nello stesso periodo.

In questo contesto appare evidente la necessità di misure di controllo della SD non basate sul trattamento antimicrobico. Infatti questi non sono spesso più efficaci per la presenza di ceppi multi-resistenti, mentre l'uso indiscriminato di antibiotici sta divenendo inaccettabile per ragioni di sanità pubblica, legate alla necessità di contenere l'antibiotico-resistenza.

Categorie di sostanza secca fecale	Campioni di feci positivi per <i>B. hyodysenteriae</i> (%)
1	39 (59.1)
2	5 (7.6)
3	11 (16.7)
4	9 (13.6)
Non eseguiti	2 (3)
Totale	66 (100)

Tabella 1: distribuzione dei campioni di feci positivi per *B. hyodysenteriae* all'esame batteriologico, suddivisi per categoria di sostanza secca. Tra parentesi il valore in percentuale (%). I campioni che rientrano nella categoria dei 'non eseguiti' si riferiscono a quei casi in cui lo scarso contenuto della ampolla rettale non ha consentito l'esecuzione del test.

		LEGENDA:																						
		● Suino positivo per <i>B. hyodysenteriae</i> /presenza diarrea										○ Suino negativo per <i>B. hyodysenteriae</i>												
		● Suino positivo per <i>B. hyodysenteriae</i> /assenza diarrea										● Capo non campionato												
		NUMERO PRELIEVI																						
Cap.	Box	ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	3	1																						
		2																						
		3																						
		4																						
		5																						
		6																						
		7																						
	8																							
	9																							
	10																							
	11																							
	12																							
	13																							
	14																							
	15																							
	16																							
	17																							
	18																							
	19																							
	20																							
	21																							
22																								
23																								
24																								
25																								
26																								
27																								
28																								
29																								
30																								
31																								
32																								
33																								
34																								
35																								
36																								
37																								
38																								
39																								
40																								
41																								
42																								
43																								
44																								
45																								
46																								
47																								
48																								
49																								
50																								

Griglia 1: sono indicati i prelievi, il capannone di appartenenza e relativi box dei suini campionati.

Identificativo Campione	n. copie di DNA/ g di feci	Colturale	S.S.%
1	7,82*10 ⁴	pos	1
3	1,07*10 ⁶	pos	1
4	4,58*10 ⁵	pos	1
6	4,47*10 ⁴	pos	1
7	4,07*10 ⁶	pos	3
16	8,65*10 ⁴	neg	1
21	1,31*10 ⁵	neg	1
24	1,67*10 ⁵	pos	3
32	4,51*10 ⁶	pos	1
34	1,19*10 ⁷	pos	4
35	5,03*10 ⁷	pos	2
37	2,60*10 ⁶	pos	4
6	7,96*10 ³	pos	4
38	1,31*10 ⁴	pos	1
39	8,15*10 ⁵	pos	1
14	6,46*10 ⁴	pos	1
41	4,54*10 ⁶	neg	4
43	1,61*10 ⁵	neg	1

Tabella 2: sono indicati i campioni positivi in PCR real-time per *B. hyodysenteriae*, l'animale di provenienza, il relativo esito dell'esame colturale e la categoria di sostanza secca fecale. È indicata la stima delle copie di DNA/g di feci dopo quantificazione.

BIBLIOGRAFIA:

1. Hampson D.J., La T., Adler B., Trott D.J. (2006) "Proposed revisions to the nomenclature for *Brachyspira* membrane proteins and lipoproteins." *Microbiology* 152:1-2.
2. Råsbäck T., Fellström C., Bergsjø B., Cizek A., Collin K., Gunnarsson A., Jensen S.M., Mars A., Thomson J., Vyt P., Pringle M. (2005) "Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test." *Vet Microbiol.* 109(3-4):229-43.
3. Alvarez-Ordóñez A., Martínez-Lobo F.J., Arguello H., Carvajal A., Rubio P. (2013) "Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease." *Int J Environ Res Public Health.* 10;10(5):1927-47.
4. Merialdi G. "Coliti da *Brachyspira*" in "Le patologie del maiale" (2013) 1a edizione. Point VeterinaireItalieEditore.

5. Patterson A.H., Rubin J.E., Fernando C., Costa M.O., Harding J.C., Hill J.E. (2013) "Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of "*Brachyspirahampsonii*-associated colitis." *BMC Vet Res.* 11, 9-137.
6. Pedersen K.S., Stege H., Nielsen J.P. (2011) "Evaluation of a microwave method for dry matter determination in faecal samples from weaned pigs with or without clinical diarrhoea." *Prev Vet Med.*100, 163-170.
7. Sebastiani C., Cucco L., Ciullo M., Maresca C., Scoccia E., Tartaglia M., Magistrali C.F. (2013) "Valutazione di un test di PCR real-time per la diagnosi delle enteriti batteriche del magronaggio ed ingrasso." *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini* 203-211
8. La T., Collins A.M., Phillips N.D., Oksa A., Hampson D.J. (2006) "Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspirapilosicoli* in porcine faeces." *LettApplMicrobiol.* 42(3):284-8.
9. Francis D.H. (2002) "Enterotoxigenic *Escherichia Coli* infection in pig and its diagnosis." *J. Swine Health Prod.*, 10 (4)171-175.
10. Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ. (1993) "Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, *ilealsymbiontintracellularis*, in feces by polymerase chain reaction." *J ClinMicrobiol.* 31(10):2611-5.
11. Rohde J., Klessner M., Baums C.G., Amtsberg G. (2004) "Comparison of methoSD for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany." *Vet.Microbiol* 19;102(1-2):25-32.
12. Ronne H., Szancer J. (1990) "In vitro susceptibility of Danish field isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemiotherapeutics". In: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne, Switzerland*, 126.
13. Willems H., Reiner G. (2010) "A multiplex PCR real-time for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspirahyodysenteriae*, *Brachyspirapilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123, 205-209.
14. Cucco L., Chiancone F.M., Dettori A., Boriosi G., Sebastiani C., Pezzotti G., Magistrali C.F. (2014) "Studio trasversale sull'eliminazione fecale di *B. hyodysenteriae* in un allevamento di scrofe endemicamente infetto." *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini* 153-160.
15. Barcellos DE, Mathiesen MR, de Uzeda M, Kader II, Duhamel GE. (2000) "Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil." *Vet Rec.* 146(14):398-403.
16. Biksi I, Lorincz M, Molnár B, Kecskés T, Takács N, Mirt D, Cizek A, Pejsak Z, Martineau GP, Sevin JL, Szenci O. (2007) "Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs." *Acta Vet Hung.* 2007 Jun; 55(2):219-27.
17. Pires A.F.A., Funk J.A., Lim A., Bolin S.R. (2013) "Enumeration of *Salmonella* in feces of naturally infected pigs." *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11):933-7.
18. Greiner M., Gardner I.A. (2000) "Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests." *Prev Vet Med.* 45(1-2):3-22.