

IL RUOLO DEL TRASPORTO AL MACELLO NELLA DIFFUSIONE DELLA DISSENTERIA SUINA

THE ROLE OF TRANSPORTATION TO SLAUGHTERHOUSE IN THE SWINE DYSENTERY SPREADING

LAZZARO M.¹, GIACOMINI E.¹, SANTUCCI G.¹, MAISANO A.M.¹, SCALI F.¹,
BONIOTTI M. B.¹, CORRADI A.², GASPARRINI S.¹, PASQUALI P.^{3,4}, ALBORALI G. L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Brescia

²Università degli Studi di Parma - Dipartimento di Scienze Veterinarie

³Istituto Superiore di Sanità

⁴ Centro di Riferenza per la Sanità Pubblica Veterinaria FAO

Parole chiave: Dissenteria suina, *Brachyspira hyodysenteriae*, Trasporti

Key words: Swine dysentery, *Brachyspira hyodysenteriae*, Transportation

Riassunto: *Brachyspira hyodysenteriae*, principale agente della dissenteria suina (SD), può essere introdotta in azienda attraverso diverse vie. L'obiettivo dello studio è stato indagare la presenza dell'agente nei camion che trasportano suini al macello, così da definirne il potenziale ruolo nella diffusione. Sono stati selezionati casualmente 212 camion presso due macelli industriali ed i campioni ambientali prelevati tra lo scarico dei suini e le procedure di sanificazione. Lo screening per la ricerca di *B. hyodysenteriae* è stato effettuato con PCR-Real Time. Sono risultati positivi 84 dei 1322 (6,26%) campioni raccolti che provenivano da 49 dei 212 (23,11%) camion controllati. La probabilità d'identificare un campione positivo da un camion aumentava col numero di controlli fino al 94,44% (>20 campioni/veicolo). L'*odds ratio* dei veicoli con almeno 10 campioni è risultato 37,94 (IC 95% 14,03-102,61, P<0,0001) rispetto agli altri. I veicoli possono rappresentare una fonte di rischio per la diffusione di *B. hyodysenteriae* e le procedure di sanificazione degli automezzi al macello sono un punto critico. Un monitoraggio regolare, su campioni pre- e post-sanificazione, può fornire informazioni rilevanti su fonti di diffusione e prevenzione della SD. Per limitare i rischi di propagazione di *B. hyodysenteriae* attraverso il trasporto, pulizia e disinfezione degli automezzi al macello sono fondamentali così come le misure di biosicurezza in azienda, soprattutto legate al carico dei suini.

Abstract: *Brachyspira hyodysenteriae*, the main cause of swine dysentery (SD), can be introduced in a herd through different ways. The aim of this study was to investigate the presence of *B. hyodysenteriae* in trucks transporting pigs to slaughterhouses, hence, to define their potential role in spreading the agent. Trucks were randomly selected at two large slaughterhouses; environmental samples were collected between the unload of pigs and cleaning procedures. A multiplex real time-PCR was used to screen the presence of *B. hyodysenteriae*. 84 out of 1332 (6.26%) collected samples were PCR positive, those samples were collected from 49 out of 212 (23.11%) selected trucks. Likelihood of identifying, at least, one positive sample from a truck increased according to number of samples per trucks, up to 94.44% (<20 samples/truck). Odds ratio of trucks sampled at least 10 times was 37.94 (95% CI 14.03-102.61; P<0,0001) when compared with others. Trucks may represent a potential source of *B. hyodysenteriae* spreading while cleaning and disinfection procedures at the slaughterhouse are a critical point which should be controlled. Regular screening, on samples collected before and after cleaning, should provide relevant information regarding

spread and prevention of SD. Risks of spreading *B. hyodysenteriae*, via trucks, can be greatly decreased by proper cleaning and disinfection at the slaughterhouse. Biosecurity measures at farm, particularly when loading pigs, can further reduce those risks.

INTRODUZIONE

La dissenteria del suino (SD), comunemente nota come diarrea rossa, è una patologia enterica che può avere impatti sanitari ed economici notevoli in allevamento, soprattutto durante i periodi di crescita e finissaggio dei suini da ingrasso. La SD è sostenuta primariamente da *Brachyspira hyodysenteriae*, tuttavia, altre spirochete emolitiche del genere *Brachyspira*, come *Brachyspira hampsonii*, sono state identificate tra i possibili agenti di SD (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; Mirajkar *et al.*, 2016), tuttavia quest'ultima non è mai stata isolata in Italia.

La trasmissione di *B. hyodysenteriae* avviene sovente tra suini per via diretta con ingestione di deiezioni infette, inoltre, l'agente può essere introdotto e diffuso in allevamento anche attraverso altre modalità quali calzature ed indumenti contaminati di visitatori e personale, veicoli per il trasporto dei suini ed animali selvatici in grado di accedere all'azienda (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013).

I camion dediti al trasporto dei suini possono costituire un'importante fonte di rischio per la propagazione della malattia tra allevamenti anche distanti, in particolar modo quelli adibiti al trasporto verso i macelli (Thakur *et al.* 2016). In linea generale, il rischio di trasmissione degli agenti infettivi tende ad aumentare progressivamente quando il trasporto degli animali riguarda più allevamenti, anche se i carichi sono separati temporalmente in diversi invii mono-allevamento (Bigras-Poulin *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2013).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello d'indagare l'eventuale presenza di *B. hyodysenteriae* sui mezzi che trasportano i suini al macello, così da inquadrarne il potenziale ruolo nella diffusione del batterio.

MATERIALI E METODI

Campionamento e analisi di laboratorio

Nel periodo tra gennaio del 2015 e luglio del 2017, sono stati campionati 212 camion presso due macelli industriali del nord Italia; i camion trasportavano unicamente suini pesanti a fine ciclo provenienti da: nord Italia, centro Italia, alcuni Paesi UE (Francia, Croazia, Ungheria).

I campioni sono stati prelevati, dopo lo scarico dei suini, tramite *sponge stick* sterili monouso, strisciando questi ultimi lungo il perimetro e nei quattro angoli del piano inferiore dei camion. La scelta degli automezzi è stata casuale, tuttavia, il numero di volte in cui ciascun veicolo è stato campionato durante il periodo dello studio è stato vincolato dall'orario e dal giorno della settimana in cui gli operatori potevano eseguire i prelievi. I camion sono stati categorizzati in base al numero di campionamenti cui sono stati sottoposti e suddivisi in quattro categorie di ordine crescente: prima (1-4 campionamenti); seconda (5-9); terza (10-19); e quarta (>20). Tutti i campioni sono stati trasportati nei rispettivi sacchetti sterili a temperatura di +4°C e processati in giornata.

Analisi di laboratorio

I campioni sono stati analizzati presso la sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) e sono stati processati secondo il seguente protocollo diagnostico: i campioni sono stati lavati con 50 ml di soluzione salina e il liquido di lavaggio è stato trasferito in una provetta sterile per la

chiarificazione in centrifuga a 1500 rpm per 5 minuti. L'estrazione del DNA è stata eseguita con 1 ml del surnatante di ciascun campione utilizzando il kit d'estrazione DNeasy Blood & Tissue (Qiagen® GmbH, Germania). Il DNA batterico è stato eluito in 100 µl di buffer di eluizione. Successivamente i campioni, così composti, sono stati processati tramite PCR-Real Time secondo la metodica descritta da Willems e colleghi (Willems *et al.*, 2010).

Analisi statistiche

La gestione del database, i calcoli di prevalenza e relativo intervallo di confidenza al 95% (IC95%) sono stati eseguiti col software Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA). Il confronto tra le frequenze di veicoli positivi e negativi, secondo il numero di campionamenti per singolo camion (*cut-off* 10 campioni/veicolo), è stato eseguito col test esatto di Fisher; tale test è stato svolto utilizzando GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Campionamento

In totale, durante il periodo dello studio, sono stati raccolti 1342 campioni; In tabella 1 sono riportati i risultati, suddivisi per anno, relativi al campionamento ed alle prevalenze dei tamponi positivi a *B. hyodysenteriae*.

I campioni positivi derivavano da 49 (23,11%) dei 212 camion presi in esame, in questi 49 veicoli la mediana di campioni positivi sul totale dei raccolti è stata pari a 11,76% (*range* 2-100%).

Categorizzazione dei veicoli

In figura 1 è illustrata la distribuzione di campion per ciascuna categoria. La maggior parte degli automezzi apparteneva alla prima categoria (1-4 campionamenti) per un totale di 145 veicoli; nella seconda (5-9), terza (10-19) e quarta (≥ 20) categoria sono stati identificati rispettivamente 32, 17 e 18 camion. In figura 2 sono illustrate le frequenze di positività, a livello di camion (almeno un campione positivo), per ciascuna categoria. Il numero di campioni eseguiti per ciascun automezzo ha influenzato significativamente ($P < 0,0001$) la frequenza di positività a livello di camion. L'*odds ratio* dei veicoli campionati almeno dieci volte è risultato pari a 37,94 (IC 95% 14,03-102,61) rispetto a quelli campionati da una a nove volte.

Tab. 1 - Campionamento e risultati suddivisi per anno: campioni totali, campioni positivi alla PCR, prevalenze e relativi intervalli di confidenza al 95%.

Tab. 1 - Sampling and results by year: total samples, PCR-positive samples, prevalence, and 95% confidence interval.

Anno	Campionamento			
	Totale	Positivi	Prevalenza (%)	IC95 (%)
2015	531	41	7,72	5,45-9,99
2016	197	16	8,12	4,31-11,93
2017	614	27	4,40	2,78-6,02
TOT	1342	84	6,26	4,96-7,56

Fig. 1 - Numero di veicoli suddivisi per categoria, la categorizzazione degli automezzi è stata effettuata considerando il numero di campionamenti per camion durante il periodo dello studio.

Fig. 1 - Number of trucks per category, trucks categorisation was carried out considering the number of sample per truck during the study.

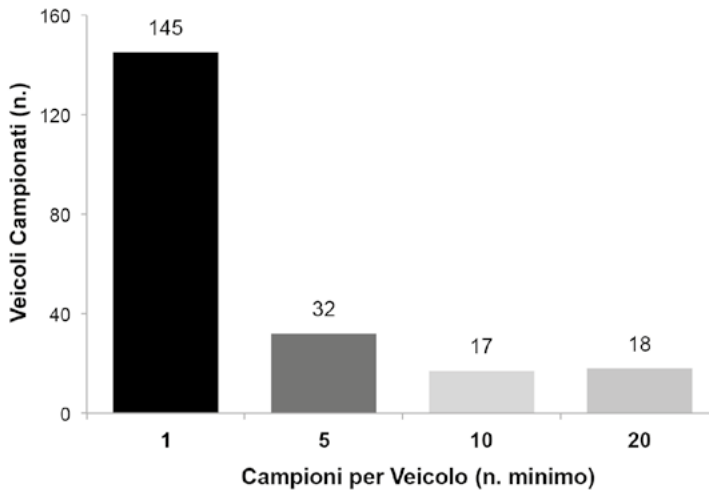
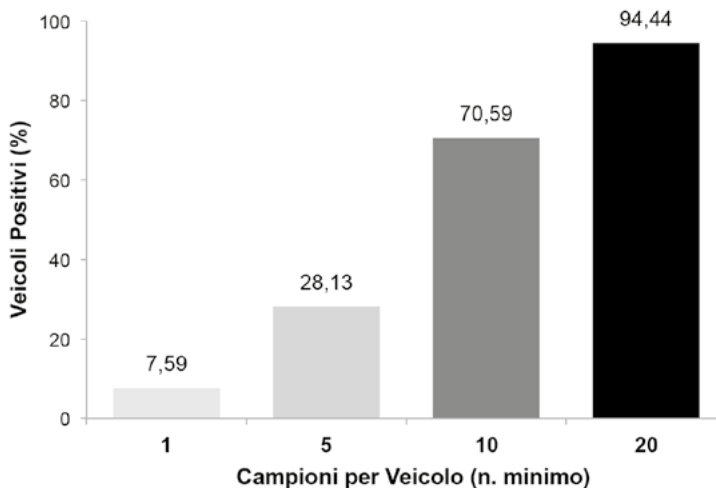


Fig. 2 - Prevalenze, suddivise per categoria, di *B. hyodysenteriae* a livello di camion. La categorizzazione degli automezzi è stata effettuata considerando il numero di campionamenti per camion durante il periodo dello studio.

Fig. 2 - B. hyodysenteriae prevalences, at truck-level, for each category. Trucks categorisation was carried out considering the number of samples per truck during the study.



DISCUSSIONE

La prevalenza di campioni positivi a *B. hyodysenteriae*, su un totale di 1342, si è assestata attorno al 6%; un risultato in linea con quanto evidenziato in uno studio pubblicato recentemente (Giacomini *et al.*, 2018); inoltre, anche esaminando tali risultati stratificati per anno (vedi tab. 1), date le sovrapposizioni degli IC, non sono emerse vistose variazioni nella prevalenza, nonostante la distribuzione dei campioni raccolti non fosse omogenea nei diversi periodi.

L'impossibilità di effettuare un monitoraggio uniforme e sistematico di tutti i veicoli campionati ha rappresentato uno dei principali limiti di questo studio, tuttavia, sono comunque emersi risultati interessanti. Mettendo a confronto le informazioni illustrate in figura 1 e figura 2 si può osservare quanto aumenti la probabilità di rilevare almeno un campione positivo su un camion in seguito a controlli ripetuti, anche se il numero di camion appartenenti alle due categorie con la maggior quantità di campioni/veicolo sia notevolmente inferiore alle altre due (fig. 1). Tale andamento è stato confermato anche dal test esatto di Fisher, eseguito considerando un *cut-off* di 10 campioni/veicolo, caratterizzato da un *p-value* molto basso ($< 0,0001$) e *odds ratio* elevato (> 35). Verosimilmente, se i veicoli appartenenti alle prime due categorie e risultati sempre negativi fossero stati monitorati più frequentemente durante lo studio avrebbero anch'essi mostrato delle positività.

Il ruolo dei veicoli utilizzati nel trasporto di animali nella diffusione indiretta (vettori inanimati) di alcuni agenti infettivi è noto, come ad esempio per l'afta epizootica (Alexandersen *et al.*, 2003), la sindrome respiratoria riproduttiva dei suini (Dee *et al.*, 2002; Dee *et al.*, 2004a) e la diarrea epidemica del suino (Lowe *et al.*, 2014). Un recente studio ha evidenziato potenziali rischi legati al trasporto di animali vivi anche per *B. hyodysenteriae*, identificando delle positività persino in campioni provenienti da camion che avevano già subito i trattamenti di pulizia e disinfezione (Giacomini *et al.*, 2018). Tali positività erano piuttosto rare ($< 1\%$) tuttavia la prevalenza nei controlli post-sanificazione è stata verosimilmente sottostimata data la difficoltà degli Autori a campionare i veicoli teoricamente puliti, soprattutto camion con programmi di consegna molto fitti (Giacomini *et al.*, 2018).

È importante ricordare che i rischi legati al trasporto possono però essere mitigati da adeguate procedure di pulizia e disinfezione dei i veicoli adibiti al trasporto nonché da rigorose misure di biosicurezza presso l'entrata in allevamento (Robertson *et al.*, 1992; Dee *et al.*, 2004b). Inoltre, nuove tecniche biomolecolari, quali MLVA o MLST, possono aiutare a comprendere e tracciare sia l'evoluzione dei ceppi sia le fonti della loro diffusione (Mirajkar *et al.*, 2014; Gasparini *et al.*, 2017; Giacomini *et al.*, 2018).

CONCLUSIONI

La forte influenza che il numero di campionamenti per veicolo sembra esercitare sulla frequenza delle positività, a livello di singolo camion, suggerisce che il monitoraggio debba essere eseguito con una certa regolarità per raggiungere risultati attendibili. I campioni ambientali raccolti sui camion potrebbero peraltro essere sfruttati anche per lo screening di diversi agenti patogeni ad elevato impatto (sanitario, economico e zoonosico) così da delineare un quadro epidemiologico più ampio.

L'elevata frequenza di positività a livello di camion, rilevata nei veicoli campionati ripetutamente, rende evidente, ancora una volta, quanto sia indispensabile per gli autotrasportatori seguire sistematicamente uno scrupoloso protocollo di pulizia e sanificazione; poiché gli automezzi possono fungere da vettore per la disseminazione di *B. hyodysenteriae*. Le procedure di lavaggio e disinfezione dei veicoli rappresentano un punto critico di controllo, per impedire la diffusione di *B. hyodysenteriae* e altri patogeni, in

particolare a livello di macello ove i ritmi serrati impongono tempi ridotti; pertanto, anche dopo queste procedure andrebbero effettuati degli screening, a cadenza regolare, così da verificare l'efficacia della sanificazione.

Al fine di ridurre il rischio che l'agente venga introdotto in azienda da veicoli non correttamente sanificati è importante seguire sempre le buone norme di biosicurezza, in particolare: utilizzare un'area di carico dei suini separata; impedire al trasportatore di accedere ai capannoni; creare una barriera sanitaria tra "area sporca" ed "area pulita"; fornire sempre indumenti e calzature monouso ai visitatori; adottare ove possibile il tutto pieno-tutto vuoto.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez-Ordóñez A, Martínez-Lobo FJ, Arguello H, Carvajal A, Rubio P. (2013) Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int J Env Res Public Health*. 10(5):1927-47.
- Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJM. (2003) The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol*. 129(1):1-36.
- Bigras-Poulin M, Barfod K, Mortensen S, Greiner M. (2007) Relationship of trade patterns of the Danish swine industry animal movements network to potential disease spread. *Prev Vet Med*. 80(2-3):143-65.
- Dee S, Deen J, Rossow K, Wiese C, Otake S, Joo HS, Pijoan C. (2002) Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can J Vet Res*. 66(4):232-9.
- Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. (2004a) An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can J Vet Res*. 68(2):128-33.
- Dee S, Deen J, Burns D, Douthit G, Pijoan C. (2004b) An assessment of sanitation protocols for commercial transport vehicles contaminated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res*. 68(3):208-14.
- Gasparrini S, Alborali GL, Pitozzi A, Guarneri F, Giacomini E, Baldo V, Scali F, Lazzaro M, Beatrice BM. (2017) Characterization of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italy by multilocus sequence typing and multiple locus variable number tandem repeat analysis. *J Appl Microbiol*. 123(2):340-451.
- Giacomini E., Gasparrini S., Lazzaro M., Scali F., Boniotti MB., Corradi A., Pasquali P., Alborali G.L. (2018) The role of transportation in the spread of *Brachyspira hyodysenteriae* in fattening farms. *BMC Vet Res*. 2018 Jan 10;14(1):10.
- Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang JQ, Connor J, Yeske P, Loula T, Levis I, Dufresne L, Main R. (2014) Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging Infect Dis*. 20(5):872-4.
- Mirajkar NS, Gebhart CJ. (2014) Understanding the molecular epidemiology and global relationships of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: a multi-locus sequence typing approach. *PLoS One*. 9(9):e107176.
- Mirajkar NS, Phillips ND, La T, Hampson DJ, Gebhart CJ. (2016) Characterization and recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to pigs. *J Clin Microbiol*. 54(12):2942-9.

- Robertson ID, Mhoma JR, Hampson DJ. (1992) Risk factors associated with the occurrence of swine dysentery in Western Australia: results of a postal survey. *Aust Vet J.* 69(4):92-1.
- Smith RP, Cook AJC, Christley RM. (2013) Descriptive and social network analysis of pig transport data recorded by quality assured pig farms in the UK. *Prev Vet Med.* 108(2-3):167-77.
- Thakur KK, Revie CW, Hurnik D, Poljak Z, Sanchez J. (2016) Analysis of swine movement in four canadian regions: network structure and implications for disease spread. *Transbound Emerg Dis.* 63(1):e14-26.
- Willems H, Reiner GA. (2010) Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 123(5-6):205-9.