

LA DISINFEZIONE COME STRUMENTO DI BIOSICUREZZA NELL'ALLEVAMENTO SUINO: INDAGINE DEI BATTERI PATOGENI AMBIENTALI E DELLA RELATIVA ANTIBIOTICORESISTENZA

DISINFECTION AS A BIOSECURITY TOOL IN PIG FARMS: SURVEY ON ENVIRONMENTAL PATHOGEN BACTERIA AND THEIR ANTIBIOTICAL RESISTENCE

PERRUCCIA.

Dipartimento di Scienze Veterinarie Università degli Studi di Torino

Parole chiave: biosicurezza, allevamento suino, LA-MRS

Keywords: biosecurity, pig farms, LA-MRS

RIASSUNTO

Recentemente, l'interesse verso la biosicurezza e la sanificazione degli ambienti nell'allevamento suino è cresciuto a causa di agenti infettivi epidemici. L'obiettivo dello studio era di monitorare l'implementazione della biosicurezza in 20 aziende suinicole tramite programmi su misura della durata di 12 mesi, affiancati dalla formazione del personale sulle procedure di disinfezione degli ambienti. La rilevazione dell'ATP ambientale è stata utilizzata come biomarker. In un sottocampione di 10 aziende, i tamponi sono stati analizzati anche per rilevare batteri sentinella di antibioticoresistenza: *Livestock-Associated* Stafilococchi Meticillino Resistenti (LA-MRS) ed *Extended spectrum β -lactamase producing E. coli* (ESBL-*E. coli*). Un significativo miglioramento dello score medio della biosicurezza ($P = 0,047$) e del valore di ATP ambientale ($P = 0,039$) è stato osservato nei 12 mesi. Tra i siti di campionamento, il tubo di alimentazione ed il beverino hanno mostrato i valori più alti di ATP ($P = 0,048$) residui dopo i lavaggi. Nei tamponi ambientali LA-MRS è stato rilevato in 58/80 siti di campionamento ed ESBL-*E. coli* in 13/80. Confrontando quanto ritrovato nel pre- e nel post-sanificazione è stata osservata un lieve calo di LA-MRS (2,5%) ed un marcato decremento di ESBL-*E. coli* (27,5%). I risultati suggeriscono che un piano su misura che includa la formazione del personale sia utile per migliorare biosicurezza e pulizia aziendali. In un'ottica *One Health*, maggiori sforzi andrebbero indirizzati verso procedure specifiche per LA-MRS, anche per la salute dell'operatore.

ABSTRACT

Recently, interest in biosecurity, especially in ambient sanitization, has enormously increased because of epidemical infective agents and their rapid spread through globalization. The aim of this study was to monitor biosecurity measures implementation in pig farms along with a project of staff training and specific 12 months intervention, including environmental investigation (ATP). Moreover, in a sub-sample of 10 farms, swabs, collected before and after the sanitization procedures, were analyzed to detect antibiotic resistant bacteria: *Livestock Associated *Satphylococcus* Methicillin Resistant* and ESBL – *E. coli*. A significant improvement of the biosecurity average score was observed during these 12 months ($P=0,047$) and the average level of ATP in environmental swabs has decreased. A tailor-made biosecurity implementation plan associated with the detection of ATP level and personnel training seems to be useful to

improve the application of biosecurity measures and the farmers' awareness regarding weakness of their own procedures, including hygiene management. The feeding tubes and nipple drinkers were found to be the sample sites with the highest ATP level. In the environmental swabs LA-MRSA was detected in 58/80 sampling sites and ESBL-*E. coli* in 13/80. Comparing the fundings in the pre- and post-sanitizations it was observed a moderate decreased of LA-MRS (2,5%) and a sharp decline of ESBL-*E. coli* (27,5%). These results suggest that sanitization is an important part of biosecurity, and it must be included in farms improvement plans, especially considering the risk for human health and in terms of *One Health* due to the isolation of MRSA and ESBL form environmental swabs in barns.

INTRODUZIONE

La biosicurezza consiste nell'applicazione di misure atte a limitare l'ingresso e la diffusione di un agente infettivo in allevamento e rappresenta la chiave per prevenire e/o limitare il rischio di infezione degli animali, ed è ormai pacifico che un più alto livello di biosicurezza è essenziale per il benessere animale e per migliorare le performance produttive dell'allevamento [1,2,3]. La sanificazione è una misura di biosicurezza, che, se adeguata, impedisce il perpetuarsi dell'infezione negli animali successivamente accasati. In passato l'igiene in allevamento è stata sottostimata, ma negli ultimi tempi è via via riconosciuta come una dei componenti fondamentali di un buon management aziendale: una scarsa condizione igienica in allevamento riduce le performance produttive, e rappresenta un importante fattore di rischio per la salute degli animali [4].

Il personale è un elemento chiave nella gestione aziendale [5]: la scarsa formazione del personale e la mancanza di comunicazione fra il personale sono fattori associati alla non-compliance dell'applicazione della biosicurezza [6,7]. Infatti, l'educazione e l'informazione sono considerate elementi chiave per l'applicazione di una routine di biosicurezza [8,9], che deve essere messa in pratica proprio dal personale. Nonostante ciò, alcuni autori riportano che spesso fra tutte le strategie per la prevenzione delle malattie infettive gli allevatori non scelgono la formazione del personale su questo tema, nonostante sia considerato un intervento a basso costo [10]. Assicurare un migliore stato sanitario degli animali attraverso l'implementazione della biosicurezza e un buon protocollo di sanificazione comporta un minor bisogno di ricorrere ai trattamenti antibiotici [5,7], con risvolti positivi per la lotta contro l'antimicrobicoresistenza [11] ed economici per l'allevatore. Perciò i costi per l'implementazione della biosicurezza non dovrebbero essere percepiti dall'allevatore come un ostacolo [12], quanto piuttosto come un investimento per ottimizzare la produzione ed ottenere un miglioramento dello stato sanitario degli animali [13].

L'obiettivo della tesi è stato quello di approfondire il tema dell'implementazione delle misure di biosicurezza e di valorizzare la sanificazione degli ambienti negli allevamenti suinicoli attraverso parametri input e output in un campione di convenienza di 20 allevamenti suinicoli nell'arco di 12 mesi. Gli input, ovvero la valutazione sistematica della biosicurezza tramite il *Biosecurity Risk Analysis Tool* (BEAT) e l'implementazione della formazione degli addetti alla sanificazione tramite la checklist, sono stati usati per sviluppare un protocollo su misura per ciascun allevamento al fine di implementare il livello di biosicurezza e le procedure di sanificazione. Il protocollo è stato monitorato per i successivi 12 mesi. Il parametro output è stato la misurazione ambientale dell'ATP, potenziale biomarker espressione di detta implementazione. Inoltre, per indagare sulla presenza di batteri sentinella di antibiotico resistenza, all'inizio dello studio sono state eseguite delle indagini batteriologiche in un sotto-campione di 10 aziende per rilevare

Livestock Associated - Stafilococchi Meticillino Resistenti (LA-MRS) e *Escherichia coli* produttori di ESBL (ESBL-*E.coli*), attraverso uno studio cross-sectional. Sono stati scelti questi microrganismi in quanto diffusi in molti tipi di produzioni animali e negli uomini che lavorano in stretto contatto con essi [14,15].

MATERIALI E METODI

Questo progetto di tesi rientra nel progetto più ampio *Healthy livestock* di *Horizon 2020*, un programma di ricerca ed innovazione dell'Unione Europea.

Aziende in esame. Nello studio sono state coinvolte 20 aziende, tutte situate nel Nord Italia, attraverso un campionamento di convenienza, selezionate in modo casuale da una lista fornita dal soccidante. Le aziende erano tutte sotto lo stesso contratto di soccida al fine di minimizzare gli effetti dei requisiti contrattuali ed i diversi tipi di accordo relativamente alla biosicurezza tra il soccidante e la soccida [16].

Il questionario BEAT. Prima del reclutamento, ciascun allevamento è stato contattato via telefono ed informato del progetto per ottenere il consenso, dato da tutti gli allevatori contattati. In totale, gli allevamenti sono stati visitati tre volte nell'arco di 12 mesi. Lo stato di biosicurezza delle 20 aziende è stato descritto usando il questionario BEAT. Il questionario ricopre diversi aspetti rilevanti della biosicurezza ed è servito per determinare se una misura preventiva è stata o meno applicata e se una specifica situazione fosse presente o assente. Questo metodo strutturato e completo per valutare la biosicurezza è stato sviluppato sulla base di conoscenze pregresse e sull'esperienza, prendendo in considerazione il modello a 3 zone della FAO [17] e la checklist dell'università di Ghent [3,18], ed è stato precedentemente applicato in ambito suinicolo da Scollo et al. [19]. Il questionario include 5 sezioni principali relative alla biosicurezza esterna e interna: la zona rossa (all'esterno del perimetro aziendale), la zona arancione (area professionale fra i ricoveri zootecnici), la zona verde (la parte interna che comprende i ricoveri per gli animali), e le due interfacce fra le zone esterna/lavorativa (rossa/arancione) e lavorativa/interna (arancione/verde). Le informazioni sullo stato attuale e passato della biosicurezza sono state raccolte con il BEAT durante una prima visita in ciascuna azienda; dopo l'identificazione dei punti critici relativi alla biosicurezza con il BEAT, è stato elaborato e messo per iscritto un piano di implementazione delle misure di biosicurezza studiato su misura per ciascun allevamento da parte dell'allevatore in collaborazione con il medico veterinario aziendale e con input da parte del personale aziendale [20]. Questo assicurava che il piano potesse effettivamente essere messo in atto da parte del personale. Dopo 6 mesi, è stato eseguito un *follow-up in progress* per verificare la compliance del piano di biosicurezza. Se necessario, il piano scritto è stato modificato o aggiornato durante la sua applicazione, come suggerito da Donaldson [20]. Dopo 12 mesi dalla prima visita lo stato di biosicurezza è stato analizzato nuovamente attraverso il BEAT. Tutte le aziende sono state visitate dal medesimo veterinario così da minimizzare il più possibile il bias legato all'intervistatore e poter assicurare il confronto della stessa azienda nelle tre visite.

Formazione del personale. All'inizio del progetto, tutti gli allevatori e il personale addetto alle procedure di sanificazione sono stati coinvolti in una formazione su tali procedure, al fine di illustrarne la corretta esecuzione per essere efficaci. Tale formazione è consistita in un incontro frontale di gruppo, al quale hanno partecipato tutti gli addetti aziendali alla sanificazione. Il docente era un esperto di sanificazione degli ambienti suinicoli. Sono stati illustrati tutti i passaggi chiave della sanificazione tramite l'utilizzo

di slides in Power Point e numerosi video e foto esemplificativi, lasciando, alla fine dell'incontro, una mezz'ora dedicata alla discussione delle problematiche riportate dai discenti. Durante i 12 mesi di studio, ciascuna azienda è stata inoltre visitata almeno una volta dall'esperto di sanificazione per l'affiancamento nelle procedure di pulizia dei capannoni.

Campionamento dei biomarker ambientali per l'analisi rapida dell'ATP. La misurazione ambientale (biomarker) della presenza di patogeni tramite il contenuto di ATP è stata effettuata in tutte e 20 le aziende alla prima e alla terza visita. La raccolta dei tamponi è stata eseguita in due momenti diversi: prima delle procedure di sanificazione (capannone sporco) e dopo le procedure di sanificazione, ovvero subito prima dell'accasamento dei nuovi animali, al fine di verificare il livello di igiene come descritto da Heinemann et al. [21]. In ciascun allevamento, sono stati individuati cinque siti di campionamento: il pavimento di fronte alla mangiatoia, il tubo di alimentazione, il beverino, il trogolo e il materiale manipolabile. Tutti i tamponi sono stati subito testati per l'analisi dell'ATP (CleanTrace Surface ATP Test Swab UXL100, 3M, Neuss, Germany), che consente di ottenere una valutazione rapida dell'efficacia delle procedure di sanificazione della struttura attraverso la valutazione della materia organica residua e della contaminazione microbiologica [22,23]. Tramite questa analisi si possono identificare in modo oggettivo i punti critici o difficili da pulire [23].

Indagini batteriologiche. Il campionamento dei tamponi ambientali per la ricerca di LA-MRS ed ESBL-*E. coli* è stato effettuato in un sottocampione di 10 aziende. In ciascun allevamento, sono stati campionati 4 siti: il beverino, il trogolo, il pavimento nell'angolo di defecazione e il materiale manipolabile. Questi sono riportati come i punti di maggior contaminazione da ESBL e LA-MRS da altri autori [21, 24]. Il prelievo è stato eseguito alla prima visita in allevamento prima della sanificazione del box e dopo la sanificazione.

Indagini microbiologiche per la ricerca di LA-MRS. L'isolamento di LA-MRS è stato eseguito come descritto da Bonvegna et al. [25] ma lievemente modificato. All'arrivo il tampone è stato inserito in un terreno liquido selettivo di prearricchimento, il *Tryptone Soy Broth – Enr* (TSB – Enr), addizionato di 2,5% di NaCl, cefoxitina (3,5 mg/L) e aztreonam (20 mg/l). La cefoxitina viene aggiunta per selezionare gli stafilococchi meticillino resistenti (MRS) mentre l'aztreonam per inibire la crescita di batteri Gram-negativi. Dopodiché i campioni sono stati messi in incubatore per 18-24 h a 37 ± 1 °C a 240 rpm. Al termine dell'incubazione, ciascun campione è stato seminato su terreno solido MSAm – FOX, costituito da MSA (*Mannitol Salt Agar*) al 6% di NaCl e addizionato di cefoxitina (FOX a 3,5 mg/L). Dopo un'identificazione presuntiva in base al fenotipo fino a 5 colonie di *Staphylococcus* sono state trapiantate sul terreno solido TSA (*Tryptic Soy Agar*) e usate per l'analisi successiva. Per l'analisi di conferma dell'identificazione fenotipica è stato usato il MALDI – TOF MS, utilizzando il software MALDI Biotyper compass 3.1 per l'identificazione del *genus* e/o della specie.

Per l'analisi genotipica di conferma sono state usate le 5 colonie trapiantate su TSA ed incubate per 24 h a 37 ± 1 °C. L'estrazione del DNA è stata eseguita con il metodo di lisi alcalina adattato da Tramuta et al. [26]. Ciascuna colonia è stata stemperata in una soluzione acquosa 1:10 di NaOH 5 M e vortexata. Dopo 30 minuti, è stato aggiunto il TRIS con volume pari al volume di soluzione NaOH usato, vortexato e centrifugato; poi l'estratto è stato congelato. Sugli estratti di DNA sono state eseguite 2 PCR, una in grado di identificare il *genus Staphylococcus* (16S rDNA *gene*), l'altra di rilevare la resistenza

genotipica alla meticillina (*mecA gene*). Ad ogni PCR sono stati aggiunti un controllo positivo (un ceppo *S. aureus* ottenuto dalla Collezione di Colture di microrganismi dell'Università di Torino) ed un controllo negativo (DNA free water).

Indagini microbiologiche per la ricerca di ESBL– E. coli. Per l'isolamento di ESBL–*E. coli* è stato seguito, ma lievemente modificato, il protocollo proposto dall'EUCAST [27]. I tamponi hanno subito un primo passaggio di prearricchimento in acqua peptonata e poi sono stati messi in incubatore a 37 ± 1 °C e 240 rpm per 18-24 h. Dopodiché ciascun campione è stato seminato su piastre con terreno solido MacKonkey 3 addizionato di 1 mg/L di cefotaxime, poi messe in incubatore a 37 ± 1 °C per 18-24 ore. Dopo un'identificazione presuntiva in base al fenotipo delle colonie di *E. coli*, fino a 5 colonie sono state trapiantate su terreno TSA e sottoposte all'analisi di conferma tramite MALDI-TOF MS. Per la conferma fenotipica è stato usato il *combination disc test*, con cui si valutano le zone di inibizione di ESBL da parte della cefalosporina da sola e con l'acido clavulanico. L'isolato è definito ESBL quando la differenza fra i due aloni è maggiore e/o uguale a 5 mm.

Analisi statistica

Per il calcolo dello score di biosicurezza è stato adottato il metodo suggerito da Diana et al. [28] ma parzialmente modificato. È stato calcolato un valore di biosicurezza in ciascuna delle cinque zone dell'allevamento sommando lo score dei vari fattori appartenenti a ciascuna zona. Tutti questi valori sono stati poi trasformati in percentuale da zero a 100, dove lo zero indicava uno scarso livello, mentre 100 indicava un buono stato. L'analisi dei dati è stata eseguita con XLSTAT 2022.2.1 (Addinson, USA, 2022). È stata eseguita un'analisi descrittiva con i dati raccolti durante la prima visita. È stato utilizzato il *Kendall Tau test* per misurare la relazione fra le variabili in entrambe le visite 1 e 3. La significatività statistica è stata fissata ad un volare di probabilità minore di 0,05. I risultati del prima e dopo il piano di intervento sono stati analizzati con il test di *Wilcoxon signed-rank* per identificare i cambiamenti dei valori della media nel tempo [29]. Per indagare i parametri output del piano di biosicurezza allevamento-specifico durante lo studio, è stata eseguita un'ulteriore analisi descrittiva sulla differenza di ciascuna parametro tra la visita 1 e la visita 3 con il test di *Kendall Tau* e con il *Principal Component Analysis* (PCA) e la *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA). Gli allevamenti con misure di biosicurezza simili sono stati aggregati in cluster con la HCA [16]. I dati derivanti dall'analisi dei tamponi per l'analisi dell'ATP sono stati analizzati con il test di *Kruskal-Wallis* con confronti multipli usando il metodo di Duns e la correzione di Bonferroni. I dati derivanti dall'indagine microbiologica sono stati valutati con una semplice analisi descrittiva.

RISULTATI

Un'analisi descrittiva degli allevamenti al momento della visita 1 e della visita 3 è riportata nella Tabella 1, mentre un'illustrazione grafica del punteggio della biosicurezza per ogni allevamento alla visita 1 e dopo l'intervento è riportata nella Figura 1. Il miglioramento medio post-intervento è stato di $1,44 \pm 2,05\%$.

Tabella 1. Analisi descrittiva degli allevamenti (n=20) all'inizio e alla fine dello studio: score di biosicurezza per ciascuna zona e valori di ATP (RLUs).

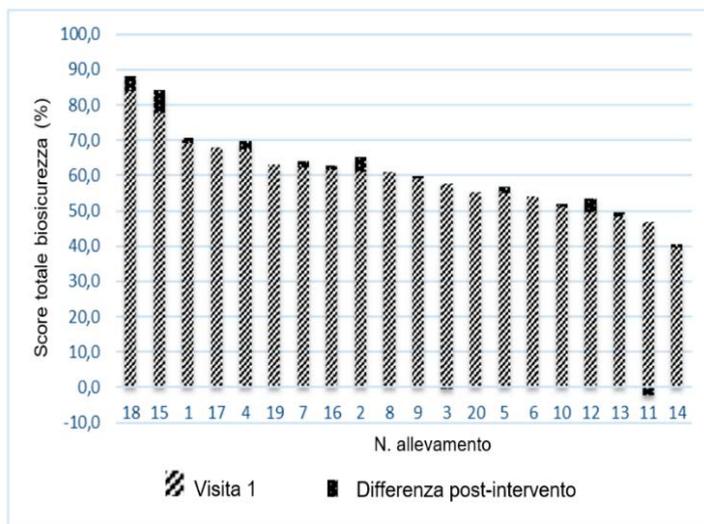
Table 1. Farms (n=20) descriptive analysis at the beginning and at the end of the study: biosecurity score for each zone and ATP values (RLUs).

	Prima visita Media ± sd (minimo-massimo)	Terza visita Media ± sd (minimo-massimo)	P-value
Punteggi di biosicurezza			
Zona rossa (%)	61,0 ± 11,2 (43,7 – 7,5)	60,5 ± 10,2 (47,9 – 87,5)	ns
Transizione rossa/arancione (%)	54,2 ± 16,6 (25,0 – 80,2)	54,9 ± 17,7 (25,0 – 84,4)	ns
Zona arancione (%)	56,2 ± 13,3 (35,0 – 85,0)	61,0 ± 14,8 (37,5 – 92,5)	0,012
Transizione arancione/verde (%)	37,6 ± 7,6 (27,6 – 48,7)	38,0 ± 7,7 (27,6 – 48,7)	ns
Zona verde (%)	69,6 ± 7,0 (58,3 – 81,5)	69,7 ± 7,5 (58,3 – 81,5)	ns
Score totale biosicurezza (%)	55,7 ± 8,7 (38,7 – 70,9)	56,8 ± 9,4 (39,5 – 77,5)	0,047
Tamponi ambientali (RLUs*)	2240 ± 1603 (179 – 8167)	1213 ± 1205 (265 – 3739)	0,031

*Unità Relative Luce

Figura 1. Punteggio totale della biosicurezza dei 20 allevamenti coinvolti nello studio e la relativa differenza nel post-intervento.

Figure 1. Total biosecurity score in the 20 farms involved in the study e their post-intervention difference.



I livelli di ATP dei tamponi ambientali nei 5 siti di campionamento (Figura 2) hanno mostrato una differenza statisticamente significativa (P-value 0.048), con i più alti livelli riscontrati nel tubo di alimentazione (3152.3 ± 2997.2 RLUs).

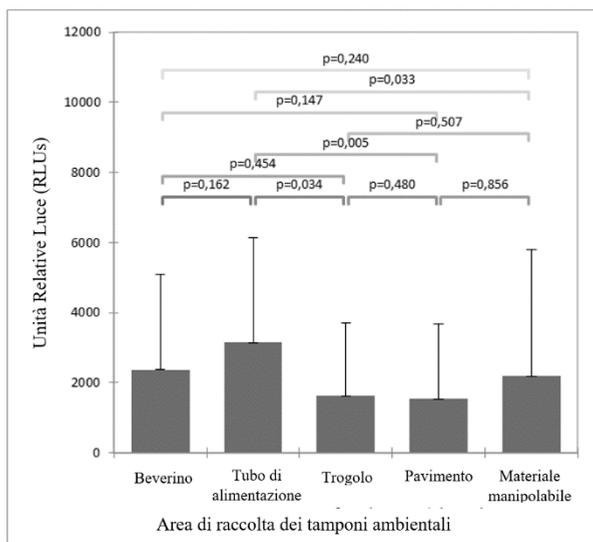


Figure 2. Valori medi del contenuto di ATP dei tamponi ambientali espresso in RLUs per ciascuno dei 5 siti di campionamento.

Figure 2. Average ATP values, in RLUs, of environmental swabs for each of 5 sampling sites.

I risultati della PCA e della HCA hanno portato all'individuazione di due cluster (1; 2) di allevamenti relativi alla relazione tra lo score di biosicurezza e i tamponi ambientali. Le principali caratteristiche che descrivono i 2 cluster sono riportati nella Tabella 2 accompagnata da una descrizione sottostante.

Tabella 2. Score di biosicurezza e dei biomarker nei 2 clusters di aziende identificati con PCA e HCA.

Table 2. Biosecurity score and ATP value in the 2 clusters of farms as identified by PCA e HCA.

Parametro	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>
N. allevamenti	8	12
Zona rossa (%)	0 ± 0	-0,2 ± 2,2
Transizione rossa/arancione (%)	3,6 ± 0,6	0,6 ± 1,7
Zona arancione (%)	11,2 ± 7,8	2,3 ± 4,0
Transizione arancione/verde (%)	5,6 ± 3,5	0,4 ± 1,1
Zona verde (%)	1,6 ± 1,2	0,1 ± 0,2
Score totale biosicurezza (%)	4,4 ± 1,7	0,6 ± 0,8
Tamponi ambientali (RLUs*)	-2837 ± 1978	-700 ± 1860

Cluster 1: allevamenti che hanno migliorato il loro score della biosicurezza e ridotto il contenuto di ATP dei biomarker. Tutte e 5 le aree hanno contribuito al miglioramento del punteggio totale di biosicurezza.

Cluster 2: allevamenti che hanno scarsamente incrementato il loro punteggio di biosicurezza e hanno mostrato un limitato calo del contenuto di ATP nei biomarker. La maggior parte degli allevamenti (12 su 20) sono rientrati in questo cluster.

I risultati delle indagini batteriologiche sono riassunti nella Tabella 3, dove per ciascun sito di campionamento è indicata la frequenza di rilevamento. Degli 80 campioni prelevati durante la visita 1 per la ricerca di LA-MRS sono risultati positivi il 65%, mentre la positività di *ESBL-E. coli* è del 16,25%. La differenza del livello di contaminazione dal pre- al post-sanificazione è molto marcato per *ESBL-E. coli* (27,5%), mentre è lieve per i LA-MRS (2,5%).

Tabella 3. Frequenza di rilevamento di LA-MRS ed ESBL - *E. coli* per ciascun sito di campionamento e la frequenza totale negli allevamenti (n = 10) coinvolti nello studio di tipo cross-sectional.

Table 3. Detection frequency of LA-MRS and ESBL-*E. coli* for each sampling site and total detection frequency in all the farms involved in the cross-sectional study (n=10).

LA-MRS	Sito di campionamento	Allevamenti del sottocampionamento (n=10) % positivi (N. Positivi/ N. totale)		
		Pre-sanificazione	Post-sanificazione	
	Beverino	70% (7/10)	60% (6/10)	
	Trogolo	80% (8/10)	70% (7/10)	
	Pavimento nell'angolo di defecazione	50% (5/10)	60% (6/10)	
	Materiale manipolabile	70% (7/10)	70% (7/10)	
% positività totale		67,5% (27/40)	65% (26/40)	65% (52/80)
ESBL - <i>E. coli</i>				
	Beverino	10% (1/10)	10% (1/10)	
	Trogolo	30% (3/10)	0% (0/10)	
	Pavimento nell'angolo di defecazione	60% (6/10)	0% (0/10)	
	Materiale manipolabile	20% (2/10)	0% (0/10)	
% positività totale		30% (12/40)	2,5% (1/40)	16,25% (13/80)

La specie di *Staphylococcus* più rilevata è stata *Staphylococcus sciuri* (31%), seguita da *S. aureus* (24%), *S. saprophyticus* (22%) e *S. equorum* (13%).

DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente lavoro era di approfondire le misure di biosicurezza applicate in un campione di convenienza di allevamenti suinicoli, e di valutare il risultato del loro miglioramento un anno dopo, a seguito dell'applicazione di un protocollo su misura studiato in base alle carenze evidenziate dal BEAT. Il BEAT è stato applicato e testato in un campione di 20 allevamenti, fornendo una valutazione del punteggio dell'implementazione iniziale e l'evoluzione nei successivi 12 mesi nelle diverse aree dell'allevamento. In base al miglioramento ottenuto da ciascuna azienda nel corso dei 12 mesi, sono stati definiti 2 profili (*clusters*) di tipologia di allevamento. Per ciascun profilo, una descrizione dell'output sottoforma di biomarker ambientale è stata fornita durante lo studio.

Il miglioramento medio delle misure di biosicurezza durante lo studio è stato statisticamente significativo, nonostante non tutti gli allevamenti avessero implementato nuove misure di insicurezza nel tempo. Il generale miglioramento dello score della biosicurezza può essere legato alla maggiore probabilità che si riesca ad ottenere l'implementazione delle misure dopo l'azione di un piano di biosicurezza elaborato su misura per ciascun allevamento, poiché viene scritto e sviluppato dall'allevatore in collaborazione con il medico veterinario aziendale, e con input forniti dal personale [20]. Questo approccio assicura che il piano di biosicurezza possa realisticamente essere implementato dal personale aziendale, instaurando

una collaborazione per identificare le “migliori pratiche” per il management aziendale che includa le misure di biosicurezza. Il fallimento nell’applicazione delle misure di biosicurezza di alcuni allevamento probabilmente è spiegato dalla scarsa motivazione nell’indagare in nuove strutture e nel cambiare la propria routine quotidiana, come riportato da altri autori [30], spinto dalla scarsa percezione dei benefici per l’allevamento [6,31,32].

Attraverso la rilevazione di materia organica residua al termine della sanificazione tramite l’analisi rapida dell’ATP, è possibile fornire una valutazione oggettiva del successo della pulizia e rendere l’allevatore maggiormente consapevole del proprio lavoro. Questo è in accordo con i cluster identificati dall’analisi statistica, in cui sono stati distinte aziende che hanno incrementato lo score di biosicurezza di pari passo ad un marcato decremento dell’ATP, e aziende che hanno scarsamente incrementato lo score di biosicurezza e registrato solo una discreta riduzione dell’ATP. Dai risultati ottenuti emerge che il tubo di alimentazione e il beverino sono i siti più contaminati e perciò devono essere considerati come i maggiori punti critici di pulizia, come riportato in altri studi [21,23]. Mannion et al. [24] hanno rilevato che dopo la sanificazione mangiatoie e beverine siano più contaminate rispetto ai pavimenti, in accordo con i nostri risultati. In generale, i siti che presentano discontinuità e fessure e che non sono ben visibili, ma richiedono di chinarsi o un’attenta ispezione visiva sembrano essere dimenticati durante la pulizia [21]. Anche il tempo è un fattore chiave per il successo della pulizia: influenza l’accuratezza delle procedure di sanificazione, e questo enfatizza l’importanza di una conoscenza dei punti deboli specifici per ciascun allevamento [34].

Un ulteriore obiettivo della tesi era quello di monitorare la presenza di germi resistenti all’interno dell’allevamento e verificare l’effetto della sanificazione su di essi. Il livello totale di contaminazione da LA-MRS trovato, corrispondente al 65% dei tamponi totali testati, è in linea con altri studi [25]; mentre il livello totale di ESBL-*E. coli* è del 16,25%, alta rispetto ad altri valori riportati in un report EFSA [35]. Fra le specie di LA-MRS, quella più rilevata è stata *S. sciuri* (31%), in accordo con altri studi [25, 36, 37]. Si ipotizza che la predominanza di *S. sciuri* nell’ambiente dell’allevamento sia legata alla colonizzazione del naso degli animali, dovuta alla loro naturale inclinazione a grufolare [25]. Inoltre, la frequenza di rilevamento di *S. aureus* meticillino-resistente è del 24%, valore in linea con altri studi, sebbene con una certa eterogeneità [15, 38, 39].

Fra le specie di LA-MRS, quella più rilevata è stata *S. sciuri* (31%), in accordo con altri studi (Bonvegna et al., 2021; Schoenfelder et al., 2017b; Sinlapasorn et al., 2015; Zhang et al., 2009). Si ipotizza che la predominanza di *S. sciuri* nell’ambiente dell’allevamento sia legata alla colonizzazione del naso degli animali, dovuta alla loro naturale inclinazione a grufolare (Bonvegna et al., 2021). Inoltre, la frequenza di rilevamento di *S. aureus* meticillino-resistente è del 24%, valore in linea con altri studi, sebbene con una certa eterogeneità (Rodríguez-López et al., 2020; Parisi et al., 2019; Pirollo et al., 2019).

Sebbene i risultati ottenuti sul miglioramento dello score di biosicurezza e sulla riduzione dei livelli di ATP ambientali, la riduzione della prevalenza di LA-MRS dal pre- al post-sanificazione è stata quasi impercettibile (-2,5%), a differenza di quanto osservato per ESBL-*E. coli* (-27,5%). Si può dunque ipotizzare che l’efficacia delle procedure di sanificazione su LA-MRS non vada necessariamente di pari passo il miglioramento delle condizioni di biosicurezza, né con i livelli di ATP ambientale post-sanificazione, bensì richiede delle procedure più specifiche. Si ipotizza inoltre che le procedure di sanificazione standard in allevamento siano più efficaci nei confronti di *ESBL-E. coli* rispetto ai LA-MRS, ma sono necessari ulteriori studi. Data la presenza di geni resistenti ai disinfettanti in *S. aureus*

meticillino-resistente originario dei suini [40], occorrono ulteriori indagini per approfondire la possibilità di resistenza ai prodotti utilizzati da parte di tali germi. Un severo protocollo di sanificazione è necessario per migliorare lo stato sanitario in allevamento: in generale, l'igiene stessa è stata proposta come *critical control point* per la valutazione dell'allevamento suinicolo [41]. In questo contesto LA-MRSA ed ESBL-*E. coli* potrebbero essere utilizzati come indicatori per la presenza di batteri resistenti nel settore suinicolo [42].

La competenza dell'operatore nell'esecuzione delle procedure di sanificazione è un elemento critico [24]: una sanificazione corretta ed efficace dipende sempre dalla competenza di chi svolge il lavoro [43-45]. La conoscenza è spesso vista come un elemento chiave per cambiare il comportamento; se gli individui non conoscono l'impatto delle proprie azioni, allora non possono aspettarsi di cambiare l'approccio verso una certa sfida [46]. La formazione del personale, fattore che in questo studio ha garantito una riduzione dei livelli di contaminazione da ATP, già descritto da Heinemann et al. [21], ha colmato la mancanza di comunicazione fra operatori e i consulenti di biosicurezza. Gli autori suggeriscono che una possibilità per migliorare il management dell'igiene in allevamento potrebbe essere lo sviluppo di un protocollo di igiene specifico per ciascun allevamento in collaborazione con un medico veterinario come supervisore. Con questo protocollo la verifica delle operazioni dovrebbe essere eseguita tramite l'autocontrollo; questa impostazione è simile a protocolli già esistenti nell'industria alimentare, conosciuti come monitoraggio dell'autocontrollo. Una formazione mirata accompagnata dal monitoraggio dei risultati può aiutare ad aumentare l'efficacia e prevenire la disattenzione dovuta alla routine.

La presenza di stafilococchi meticillino resistenti ed ESBL-*E. coli* negli animali costituisce un pericolo per gli operatori del settore: è già stata documentata la trasmissione di ceppi LA-MRSA ed ESBL-*E. coli* tra uomo e suini [14,47,48]. Questi ceppi possano passare all'uomo attraverso il contatto diretto con animali vivi e l'aria e la polvere contaminate dei capannoni [49,50]. Perciò tutti coloro che si trovano a lavorare in stretto contatto con i suini o semplicemente all'interno dei capannoni sono a rischio di contaminazione [14,15], che però si estende anche a chi ha un regolare contatto con questa classe di lavoratori [51]. Inoltre, l'aria esausta in uscita dai capannoni può essere una fonte di LA-MRSA per gli allevamenti vicini e l'ambiente [52]. Considerando i risultati del presente studio, è evidente come sia importante monitorare in allevamento tali microrganismi resistenti e potenzialmente zoonotici. La salute pubblica e l'importanza veterinaria di LA-MRSA ed ESBL-*E. coli* sottolinea il bisogno di un intervento effettivo per controllare la diffusione di questi ceppi zoonotici; è auspicabile un intervento che si basi su un approccio di tipo *One Health*.

CONCLUSIONE

I risultati del presente studio supportano l'ipotesi di altri autori riguardo l'efficacia di programmi di intervento su misura per ciascun allevamento, che derivano da una stretta comunicazione fra allevatore e veterinario, in quanto aumenta la disponibilità e la credibilità delle informazioni. Sembra che i piani elaborati su misura migliorino l'applicazione delle misure di biosicurezza e la consapevolezza degli allevatori verso i punti deboli della gestione aziendale, incluse le procedure di pulizia. La formazione del personale si è dimostrata essere fondamentale nella riduzione dei valori espressi dai biomarkers ambientali di pulizia, e la quantificazione dell'ATP sembra essere uno strumento promettente nella valutazione rapida dell'efficacia della sanificazione. Un'efficace sanificazione è un fattore chiave nel controllo delle malattie infettive con un impatto positivo sulle performance produttive dell'allevamento

e sul benessere animale [40]. Inoltre, la persistenza di LA-MRS dopo la sanificazione rappresenta un problema da affrontare con maggiori sforzi e protocolli specifici, soprattutto considerando che tali germi costituiscono un pericolo non solo per gli operatori del settore, ma per la salute pubblica in generale; è perciò auspicabile un approccio alla biosicurezza di tipo *One Health*.

BIBLIOGRAFIA

1. Gleeson, B. L., & Collins, A. M. (2015) “Under what conditions is it possible to produce pigs without using antimicrobials?” in *Animal Production Science* (Vol. 55, Issues 11–12, pp. 1424–1431).
2. Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D., & Dewulf, J. (2013). “Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds” in *Veterinary Journal*, 198(2), 508–512.
3. Ribbens, S., Dewulf, J., Koenen, F., Mintiens, K., de Sadeleer, L., de Kruif, A., & Maes, D. (2008) “A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds” in *Preventive Veterinary Medicine*, 83(3–4), 228–241.
4. Pastorelli, H., le Floch, N., Merlot, E., Meunier-Salaü N, M. C., van Milgen, J., & Montagne, L. (2012) “Sanitary housing conditions modify the performance and behavioural response of weaned pigs to feed- and housing-related stressors” in *Animal*, 6(11), 1811–1820.
5. Davies, R., & Wales, A. (2019) “Antimicrobial Resistance on Farms: A Review Including Biosecurity and the Potential Role of Disinfectants in Resistance Selection” in *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 18, Issue 3, pp. 753–774).
6. Casal, J.; De Manuel, A.; Mateu, E.; Martín, M. (2007) “Biosecurity measures on swine farms in Spain: perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures” in *Prev Vet Med*, 82, 138-150.
7. Rodrigues Da Costa, M., Gasa, J., Calderón Díaz, J. A., Postma, M., Dewulf, J., McCutcheon, G., & Manzanilla, E. G. (2019) “Using the Biocheck.UGent™ scoring tool in Irish farrow-to-finish pig farms: assessing biosecurity and its relation to productive performance” in *Porcine Health Management*, 5(1).
8. Lewerin, S. S., Österberg, J., Alenius, S., Elvander, M., Fellström, C., Tråvén, M., Wallgren, P., Waller, K. P., & Jacobson, M. (2015) “Risk assessment as a tool for improving external biosecurity at farm level” in *BMC Veterinary Research*, 11(1).
9. Sayers, R. G., Sayers, G. P., Mee, J. F., Good, M., Bermingham, M. L., Grant, J., & Dillon, P. G. (2013) “Implementing biosecurity measures on dairy farms in Ireland” in *Veterinary Journal*, 197(2), 259–267.
10. Can, M. F., Altuğ, N., & Kaygisiz, F. (2020) “Biosecurity levels of livestock enterprises in Turkey and factors affecting these levels” in *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 44, 632–640.
11. Comunicazione della Commissione europea al Consiglio e al Parlamento europeo. (2017) “Piano d’azione europeo “One Health” contro la resistenza antimicrobica”. Disponibile online: http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf. (consultato il 24 gennaio 2023).
12. Raasch, S., Collineau, L., Postma, M., Backhans, A., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Beilage, E. grosse, Stärk, K., & Dewulf, J. (2020) “Effectiveness of alternative measures to reduce antimicrobial usage in pig production in four European countries” in *Porcine Health Management*, 6(1).
13. Collineau, L., Rojo-Gimeno, C., Léger, A., Backhans, A., Loesken, S., Nielsen, E. O.,

- Postma, M., Emanuelson, U., Beilage, E. grosse, Sjölund, M., Wauters, E., Stärk, K. D. C., Dewulf, J., Belloc, C., & Krebs, S. (2017) “Herd-specific interventions to reduce antimicrobial usage in pig production without jeopardising technical and economic performance” in *Preventive Veterinary Medicine*, 144, 167–178.
14. Lewis C., H., Mølbak, K., Reese, C., Aarestrup M., F., Selchau, M., Sørum, M., & Skov L., R. (2009) “Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in Humans, Denmark” in *Emerging Infectious Disease*, 14(9).
 15. Pirolo, M., Visaggio, D., Gioffrè, A., Artuso, I., Gherardi, M., Pavia, G., Samele, P., Ciabrone, L., di Natale, R., Spatari, G., Casalnuovo, F., & Visca, P. (2019) “Unidirectional animal-to-human transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pig farming; evidence from a surveillance study in southern Italy” in *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1).
 16. De Oliveira Sidinei, M.E.A.; Marcato, S.M.; Perez, H.L.; Bánkuti, F.I. (2021) “Biosecurity, environmental sustainability, and typological characteristics of broiler farms in Paraná State, Brazil” in *Prev Vet Med*, 194, 105426.
 17. FAO. Disponibile online: https://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/news_060815b.html (consultato il 23/01/2023).
 18. BiocheckUGent, 2022 <https://biocheckgent.com/fr> (consultato il 24/01/2023).
 19. Scollo, A., Levallois, P., Fourichon, C., Motta, A., Mannelli, A., Lombardo, F., & Ferrari, P. (2022) “Monitoring Means and Results of Biosecurity in Pig Fattening Farms: Systematic Assessment of Measures in Place and Exploration of Biomarkers of Interest” in *Animals*, 12(19), 2655.
 20. Donaldson, A. (2008) “Biosecurity after the event: risk politics and animal disease” in *Environ Plan A*, 40, 1552-1567.
 21. Heinemann, C.; Meyer, I.; Bögel, F.T.; Schmid, S.M.; Hayer, J.J.; Steinhoff-Wagner, J. (2020) “Individual training for farmers based on results from protein and ATP rapid tests and microbiological conventional cultural methods improves hygiene in pig fattening pens” in *J Anim Sci*, 98, skz389.
 22. Green, T. A., Russell, S. M., & Fletcher, D. L. (1999) “Effect of Chemical Cleaning Agents and Commercial Sanitizers on ATP Bioluminescence Measurements” in *Journal of Food Protection* (Vol. 62, Issue 1).
 23. Luyckx, K., Dewulf, J., van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J., Vervae, E., Heyndrickx, M., & de Reu, K. (2014) “Comparison of sampling procedures and microbiological and nonmicrobiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses” in *Poultry Science*, 94(4), 740–749.
 24. Mannion, C.; Lynch, P.B.; Egan, J.; Leonard, F.C. (2007) “Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland” in *Vet Rec* 2007, 61, 371–375
 25. Bonvegna, M.; Grego, E.; Sona, B.; Stella, M.C.; Nebbia, P.; Mannelli, A.; Tomassone, L. (2021) “Occurrence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRcons) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from pigs and farm environment in northwestern Italy” in *Antibiotics*, 10, 676.
 26. Tramuta, C.; Robino, P.; Nucera, D.; Salvarani, S.; Banche, G.; Malabaila, A.; Nebbia, P. (2014) “Molecular characterization and antimicrobial resistance of faecal and urinary *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Italy” in *Vet Ital*, 50, 23–30. <https://doi.org/10.12834/vetit.1304.09>.
 27. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Disponibile online: http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/EUCAST_detection_resistance_mechanisms_V1.pdf (consultato il 24/01/2023).
 28. Diana, A.; Lorenzi, V.; Penasa, M.; Magni, E.; Alborali, G.L.; Bertocchi, L.; De Marchi,

- M. (2020) “Effect of welfare standards and biosecurity practices on antimicrobial use in beef cattle” in *Sci Rep*, 10, 1-13.
29. Siengsan-Lamont, J.; Kamolsiripichaiporn, S.; Ruanchaimun, S.; Patchimasiri, T.; Jongrakwattana, B.; Blacksell, S.D. (2019) “Biosafety and Biosecurity Challenges Facing Veterinary Diagnostic Laboratories in Lower-Middle Income Countries in Southeast Asia: a case study of Thailand” in *Appl Biosaf*, 24, 220-230.
 30. Maunsell, F., & Donovan, G. A. (2008) “Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements” in *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 24(1), 155–190.
 31. Laanen, M., Maes, D., Hendriksen, C., Gelaude, P., de Vlieghe, S., Rosseel, Y., & Dewulf, J. (2014) “Pig, cattle and poultry farmers with a known interest in research have comparable perspectives on disease prevention and on-farm biosecurity” in *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1–2), 1–9.
 32. Valeeva, N.I.; van Asseldonk, M.A.; Backus, G.B. (2011) “Perceived risk and strategy efficacy as motivators of risk management strategy adoption to prevent animal diseases in pig farming” in *Prev Vet Med*, 102, 284-295.
 33. Luyckx, K., Millet, S., van Weyenberg, S., Herman, L., Heyndrickx, M., Dewulf, J., & de Reu, K. (2016) “A 10-day vacancy period after cleaning and disinfection has no effect on the bacterial load in pig nursery units” in *BMC Veterinary Research*, 12(1).
 34. Gosling, R. J., Martelli, F., Wintrip, A., Sayers, A. R., Wheeler, K., & Davies, R. H. (2014) “Assessment of producers’ response to *Salmonella* biosecurity issues and uptake of advice on laying hen farms in England and Wales” in *British Poultry Science*, 55(5), 559–568.
 35. EFSA (2011) “Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals” in *EFSA Journal*, 9(8).
 36. Schoenfelder, S. M. K., Dong, Y., Feßler, A. T., Schwarz, S., Schoen, C., Köck, R., & Ziebuhr, W. (2017) “Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments” in *Veterinary Microbiology*, 200, 79–87.
 37. Sinlapasorn, S., Lulitanond, A., Angkititrakul, S., Chanawong, A., Wilailuckana, C., Tavichakorntrakoo, R., Chindawong, K., Seelaget, C., Krasaesom, M., Chartchai, S., Wonglakorn, L., & Sribenjalux, P. (2015) “SCCmec IX in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from pigs and workers at pig farms in Khon Kaen, Thailand” in *Journal of Medical Microbiology*, 64(9), 1087–1093. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000119>
 38. Rodríguez-López, P., Filipello, V., di Ciccio, P. A., Pitozzi, A., Ghidini, S., Scali, F., Ianieri, A., Zanardi, E., Losio, M. N., Simon, A. C., & Alborali, G. L. (2020) “Assessment of the antibiotic resistance profile, genetic heterogeneity and biofilm production of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from the Italian swine production chain” in *Foods*, 9(9)
 39. Parisi, A., Caruso, M., Normanno, G., Latorre, L., Miccolupo, A., Fraccalvieri, R., Intini, F., Manginelli, T., & Santagada, G. (2019) “MRSA in swine, farmers and abattoir workers in Southern Italy” in *Food Microbiology*, 82, 287–293
 40. Wong, T. Z., Zhang, M., O’Donoghue, M., & Boost, M. (2013) “Presence of antiseptic resistance genes in porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” in *Veterinary Microbiology*, 162(2–4), 977–979.
 41. Von-Borell, E., Bockisch, F.-J., Buscher, W., Hoy, S., Krieter, J., Muller, C., Parvizi, N., Richter, T., Rudovsky, A., Sundrum, A., & van den Weghe, H. (2001) “Critical control

- points for on farm assessment of pig housing” in *Livestock Production Science* (Vol. 72).
42. Schmithausen, R. M., Schulze-Geisthoevel, S. V., Heinemann, C., Bierbaum, G., Exner, M., Petersen, B., & Steinhoff-Wagner, J. (2018) “Reservoirs and transmission pathways of resistant indicator bacteria in the Biotope pig stable and along the food chain: a review from a One Health perspective” in *Sustainability* (Switzerland) (Vol. 10, Issue 11). MDPI.
 43. Carrique-Mas, J. J., Marín, C., Breslin, M., McLaren, I., & Davies, R. (2009) “A comparison of the efficacy of cleaning and disinfection methods in eliminating *Salmonella* spp. from commercial egg laying houses” in *Avian Pathology*, 38(5), 419–424.
 44. Gosling, R. (2018) “A review of cleaning and disinfection studies in farming environments” in *Livestock*, 23(5), 232–237.
 45. Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T., Tatone, F. A., Callaby, R., Rabie, A., Gosling, R. J., Fordon, S., Crocker, G., Davies, R. H., & Smith, R. P. (2017) “Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in *Salmonella* contaminated pig holdings in the United Kingdom” in *PLoS ONE*, 12(6).
 46. Shannon, C.; Stebbing, P. D.; Dunn, A.M.; Quinn, C.H. (2020) “Getting on board with biosecurity: evaluating the effectiveness of marine invasive alien species biosecurity policy for England and Wales” in *Marine Policy*, 122, 104275.
 47. Cuny, C., Wieler, L. H., & Witte, W. (2015) “Livestock-Associated MRSA: the impact on humans” in *Antibiotics* (Vol. 4, Issue 4, pp. 521–543). MDPI AG.
 48. Carattoli, A. (2008) “Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers” in *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 14, Issue SUPPL. 1, pp. 117–123). Blackwell Publishing Ltd.
 49. Friese, A., Schulz, J., Hoehle, L., Fetsch, A., Tenhagen, B. A., Hartung, J., & Roesler, U. (2012) “Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns” in *Veterinary Microbiology*, 158(1–2), 129–135.
 50. Schmithausen, R. M., Kellner, S. R., Schulze-Geisthoevel, S. V., Hack, S., Engelhart, S., Bodenstein, I., Al-Sabti, N., Reif, M., Fimmers, R., Körber-Irrgang, B., Harlizius, J., Hoerauf, A., Exner, M., Bierbaum, G., Petersen, B., & Bekeredjian-Ding, I. (2015) “Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and of *Enterobacteriaceae* expressing extended spectrum beta-lactamases on a model pig farm” in *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7633–7643.
 51. Graveland, H., Wagenaar, J. A., Bergs, K., Heesterbeek, H., & Heederik, D. (2011) “Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact” *PLoS ONE*, 6(2).
 52. Friese, A., Schulz, J., Zimmermann, K., Tenhagen, B. A., Fetsch, A., Hartung, J., & Rösler, U. (2013) “Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity” in *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2759–2766.