

NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO PER LA RICERCA DI *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* IN MAIALI MACELLATI REGOLARMENTE

NEW DIAGNOSTIC APPROACH TO THE INVESTIGATION OF ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN REGULARY SLAUGHTERED PIGS

COIN P.¹, CEGLIE L.², CONFICONI D.¹, MIOTTI SCAPIN R.¹, RAMPAZZO E.²,
NARDELLI S.², GIACCONE V.¹

¹ Università degli studi di Padova; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: mal rossino, PCR, sierologia

Key words: swine erysipelas, PCR, antibodies analysis

Riassunto: Il “mal rossino” è una zoonosi causata da *E. rhusiopathiae*, di cui il suino è il principale serbatoio in natura. Questa indagine preliminare ha l’obiettivo di valutare la presenza di *E. rhusiopathiae* in suini macellati regolarmente e di sviluppare un approccio diagnostico integrato volto all’identificazione del microorganismo. In totale sono stati campionati 89 suini appartenenti a 6 allevamenti diversi. Le matrici campionate sono state: cute (attraverso l’utilizzo di *spongebag*) e feci appartenenti allo stesso animale. Per la ricerca diretta del microorganismo dopo pre-arricchimento è stato utilizzato un saggio di SYBRGreen Real-time PCR e in caso di positività si è proceduto all’isolamento del patogeno tramite terreni selettivi. Un campione su 178 è risultato positivo alla rPCR, tuttavia all’isolamento non è stata osservata alcuna crescita del patogeno in esame. Il siero di 90 suini campionati nelle stesse partite è stato esaminato utilizzando due kit commerciali ELISA per la ricerca di anticorpi (A e B). Con la metodica A sono risultati positivi 8/90, mentre con la B 4/90 sono risultati positivi e 2/90 “dubbi”. I suini risultati positivi alla ricerca indiretta del microorganismo rientrano nello stesso allevamento del suino risultato positivo alla ricerca diretta. I risultati non permettono di definire la prevalenza di *E. rhusiopathiae* negli allevamenti suinicoli del territorio, ma possono essere utili come dati preliminari per definire un protocollo di ricerca approfondita.

Abstract: “Erysipelas” is a zoonotic disease caused by *E. rhusiopathiae* and swine is considered the most relevant reservoir of the agent. The aim of the study was to investigate its presence in slaughtered pigs without clinical signs and to evaluate a combined diagnostic approach for the identification of the microorganism. The sampled matrices were: skin (sampled using *spongebag*) and stools from the same animal. In total 89 swine belonging to 6 different farms were sampled in this study. For the detection of *E. rhusiopathiae*, two diagnostic methods were applied to these samples: SYBR Green Real-time PCR and subsequently, on the PCR positive samples culture method for isolation using selective media. The agent was identified in 1 out of 178 samples using the molecular method, but isolation on the selective media did not succeed. At the same time, two indirect ELISA kits were used to search for antibodies in sera of 90 pigs sampled from the same batches used for the microorganism detection. In test A 8/90 were positive and in the test B 4/90 were positive and 2/90 were uncertain. Positive ELISA samples belonged to the same farm of the PCR positive swine. Results obtained do not allow determining a prevalence of *E. rhusiopathiae*, but they could represent preliminary data to establish a diagnostic approach for further and more extended investigations.

INTRODUZIONE

Il mal rossino è una zoonosi causata da un batterio classificato oggi come *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Il panorama epidemiologico complessivo dell'infezione in Italia è ancora poco chiaro, in quanto non vi sono dati aggiornati sulla reale prevalenza di tale malattia all'interno degli allevamenti suini nazionali. Il progetto aveva due obiettivi: effettuare un'indagine preliminare sulla presenza di *E. rhusiopathiae* in suini macellati regolarmente provenienti da diversi allevamenti intensivi del territorio e ipotizzare un metodo diagnostico rapido ed efficace che possa essere utile ai fini della ricerca del microrganismo in suini asintomatici.

Erysipelothrix rhusiopathiae è un microrganismo conosciuto da più di un secolo. Robert Koch lo isolò per primo nel sangue di un topo nel 1876 (Brooke e Riley, 1999). Il genere *Erysipelothrix* comprende quattro specie: *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. inopinata* e *E. larvae*. Il primo ha la maggiore importanza clinica (Clark, 2015). Nel suino ci sono stati rari casi di artrite ed endocardite croniche da *E. tonsillarum*, ma si presume che non sia un patogeno così importante come *E. rhusiopathiae* (Opriessnig e Wood, 2012).

Erysipelothrix rhusiopathiae e l'infezione causata da questo microrganismo nell'uomo e negli animali hanno un distribuzione mondiale. Diversi casi nel suino sono stati documentati in Africa, Nord America, Europa, Cina, Giappone e Australia (Reboli e Farrar, 1989).

Il batterio è stato trovato come patogeno o commensale in molte specie di vertebrati tra le quali almeno 30 specie differenti di uccelli e 50 di mammiferi ed invertebrati (Opriessnig e Wood, 2012). Il serbatoio maggiore è il suino domestico pertanto l'impatto economico maggiore riguarda l'allevamento suinicolo, tuttavia l'erisipela ovvero la malattia causata da *E. rhusiopathiae* ha un impatto economico anche negli allevamenti di pecore, tacchini, anatre, polli ed emù (Brooke e Riley, 1999). Si stima che circa il 30- 50% dei suini sia portatore del batterio a livello di tonsille e altri tessuti linfoidei (Colavita *et al.*, 2006). Il microrganismo è stato isolato anche in milza, intestino e midollo osseo (Clark, 2015). Molti animali possono fungere da vettori del microrganismo, tra questi abbiamo vertebrati come roditori, uccelli, pesci ed invertebrati come mosche ed acari (Clark, 2015).

E. rhusiopathiae viene trasmesso direttamente con feci, urina, saliva e secrezioni nasali o indirettamente tramite contaminazione ambientale (Reboli e Farrar, 1989). I suini possono infettarsi dall'assunzione di cibo o acqua contaminati oppure dalla contaminazione di ferite cutanee (Wang *et al.*, 2010).

E. rhusiopathiae può resistere al massimo fino a 35 giorni nell'ambiente (Opriessnig e Wood, 2012), viene inattivato a 55°C per 15 minuti, ma riesce a resistere a temperature di refrigerazione per 10 giorni; resiste a processi di conservazione come salatura, salagione, sotto aceto (carne o bacon marinati contengono *Erysipelothrix* fino a 170 giorni oppure fino a 30 giorni se trattate con sale e nitrato di potassio) e affumicatura (Wang *et al.*, 2010).

L'erisipela suina può colpire soggetti di tutte le età, ma sono maggiormente suscettibili le scrofe gravide e suini da 2-12 mesi d'età (Craig *et al.*, 2016). La malattia si può presentare in tre forme cliniche: acuta, subacuta, cronica. L'erisipela acuta è caratterizzata, 2-3 giorni dopo l'esposizione al patogeno, da lesioni cutanee rilevate di dimensioni variabili da 1-2 cm a 4-5 cm, di colore da rosa a violaceo-rosso, con forma a losanga che scompaiono dopo 4-7 giorni (Colavita *et al.*, 2006). Il trattamento di scelta per l'erisipela acuta suina è la penicillina (Opriessnig e Wood, 2012). La vaccinazione viene considerata una procedura utile per controllare il problema negli animali (Wang *et al.*, 2010).

E. rhusiopathiae è un agente di zoonosi e sono maggiormente esposti al rischio di contagio i soggetti coinvolti in occupazioni o attività che comportano il contatto diretto con animali, prodotti animali o rifiuti di origine animale. L'infezione da *E. rhusiopathiae* è considerata una malattia professionale (Wang *et al.*, 2010) e deriva da una ferita provocata da materiale infetto o contaminato.

MATERIALI E METODI

Lo studio prevedeva due fasi analitiche:

(1) Sviluppo di un metodo diagnostico utile alla ricerca di *E. rhusiopathiae* in matrici quali cute e feci

(2) Applicazione dello stesso a campioni di suini regolarmente macellati e abbinamento di analisi sierologiche in campioni delle stesse partite.

Nella prima fase sono state effettuate diverse prove, utilizzando un ceppo di riferimento (ATCC®19414), per mettere a punto il protocollo sperimentale per l'identificazione di *E. rhusiopathiae*. Tali prove erano volte all'identificazione dei fattori che potessero massimizzare la riuscita della ricerca, considerando le matrici investigate, ossia cute e feci. In sintesi, sono state eseguite le seguenti prove:

- ♦ Prova con diversi metodi di estrazione degli acidi nucleici e prova di sensibilità analitica del metodo di rilevazione in SYBRGreen
- ♦ Prova per determinare l'influenza della bollitura precedente all'estrazione
- ♦ Prova di modifica della temperatura di *annealing* (da 60°C a 58°C)
- ♦ Prova di specificità analitica.

Il patogeno è stato cercato in forma diretta sia utilizzando la metodica microbiologica tradizionale, modificando il protocollo sperimentale messo a punto da Colavita e coll. nel 2006, sia un saggio di PCR con rivelazione in SYBRGreen che si avvale di primer specifici per *E. rhusiopathiae*, disegnati sulle sequenze di DNA codificante per la subunità 23S del gene (Takeshi *et al.*, 2009).

Sia nella fase preliminare sia in quella di campionamento l'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita con il kit di estrazione QIAmp DNA mini kit (Qiagen®). Per il saggio di PCR è stato utilizzato il kit QuantiFast™ SYBRGreen: in un pozzetto la miscela di reazione conteneva i primer specifici per il frammento del gene 23S ribosomiale di *E. rhusiopathiae*, in un secondo pozzetto la miscela di reazione conteneva i primer che amplificano un frammento del gene 18S, che costituisce il controllo interno di processo, a garanzia dell'avvenuta estrazione e corretta amplificazione del campione.

Il profilo termico di reazione di amplificazione è costituito da: attivazione (95°C per 5 minuti); 40 cicli composti da denaturazione (95°C per 15 secondi), *annealing* ed estensione (60°C per 60 secondi). All'amplificazione segue una successiva dissociazione (melting) (95°C/15 secondi, 60°C/60 secondi, 95°C/15 secondi) per determinare la specificità del prodotto amplificato.

Nelle prove preliminari di PCR, l'amplificato è stato purificato e sequenziato mediante il kit Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing, utilizzando il sequenziatore ABI Prism 3130 DNA Sequencing System con gli stessi primer dell'amplificazione. Le sequenze nucleotidiche, allestite da tre diversi amplificati, sono state allineate mediante il software ClustalX2 con sequenze di stipiti di riferimento presenti in GenBank e rappresentative di ciascun ceppo batterico d'interesse.

In un macello del Veneto sono stati eseguiti prelievi da suini appartenenti alla categoria "grassi", sia di sesso maschile che femminile; nessuno di essi presentava segni o lesioni attribuibili al mal rossino, né era stato sottoposto a vaccinazione nei confronti di *E. rhusiopathiae*. La scelta degli animali da campionare non ha seguito un criterio di selezione, ma è stata casuale per aumentare la probabilità di rilevamento del microrganismo in esame. Le analisi sono state effettuate su due diversi matrici dello stesso animale: cotenna (con *spongebag*) e feci. In totale sono stati indagati 6 differenti allevamenti, esaminando 89 suini e 178 campioni suddivisi in 89 *spongebag* e 89 campioni fecali.

I campioni di feci e le *spongebag* sono stati sottoposti a prearricchimento in TSB (*Triptic*

Soy Broth per 24 ore a 37°C. Dopo incubazione, le aliquote dei prearricchiti sono state sottoposte a estrazione degli acidi nucleici e analizzati in PCR. In caso di positività alla PCR nei campioni prearricchiti, si procedeva alla fase di arricchimento selettivo di questi ultimi. Ciascun positivo è stato inoculato in TSB modificato con aggiunta di glucosio, gentamicina, kanamicina, Tween 80 e seminato per spatolamento in agar sangue. Dopo l'incubazione (24 ore a 37°C) dal TSB, si seminava in agar sangue e in TSA modificato (*Tryptic soy agar* con Tween 80, gentamicina, kanamicina e glucosio). Le piastre sono state nuovamente incubate (24 ore a 37°C) e il giorno successivo sono state effettuate le letture. Nel caso di colonie con morfologia attribuibile a *E. rhusiopathiae*, si procedeva all'isolamento e alla conferma mediante PCR.

Parallelamente è stato condotto uno *screening* sierologico volto alla ricerca di anticorpi nei confronti del patogeno di interesse nel gruppo campionato. Tale ricerca, sebbene non sia stata svolta sui medesimi suini soggetti al campionamento di cute e feci, aveva comunque l'obiettivo di completare i dati ottenuti, perché i sieri esaminati appartenevano a suini delle stesse partite sottoposti ad analisi diretta. La ricerca sierologica è stata condotta su 90 suini provenienti da 6 allevamenti differenti

Per la ricerca indiretta, sono stati utilizzati due kit commerciali ELISA: CIVITEST SUIS SE/MR® prodotto da HIPRA, S.A. e INGEZIM MAL ROJO® prodotto da INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.

RISULTATI

Tra le 89 *spongebag* esaminate solo una è risultata positiva in PCR, mentre nessuna positività è stata riscontrata nei campioni di feci. Tali dati sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1. Risultati del campionamento mediante *spongebag* e feci e numero di campioni positivi. (N. Numero, Pos. Positività).

Table 1. Results of sampling with *spongebag* and stool and number of positive samples. (N. Number, Pos. Positive).

Allevamento	N. suini	N. <i>spongebag</i>	Pos. PCR	N. feci	Pos. PCR	Totale campioni
A	23	23	0	23	0	46
B	7	7	0	7	0	14
C	22	22	1	22	0	44
D	15	15	0	15	0	30
E	15	15	0	15	0	30
F	7	7	0	7	0	14
Totale	89	89	1	89	0	178

Il campione 992 è stato dichiarato positivo alla rPCR in quanto presentava una T_m di 81,8°C ed un picco molto simile al controllo positivo (vedi Fig. 1). Il sequenziamento dell'amplificato ha sostenuto l'ipotesi (dati non riportati).

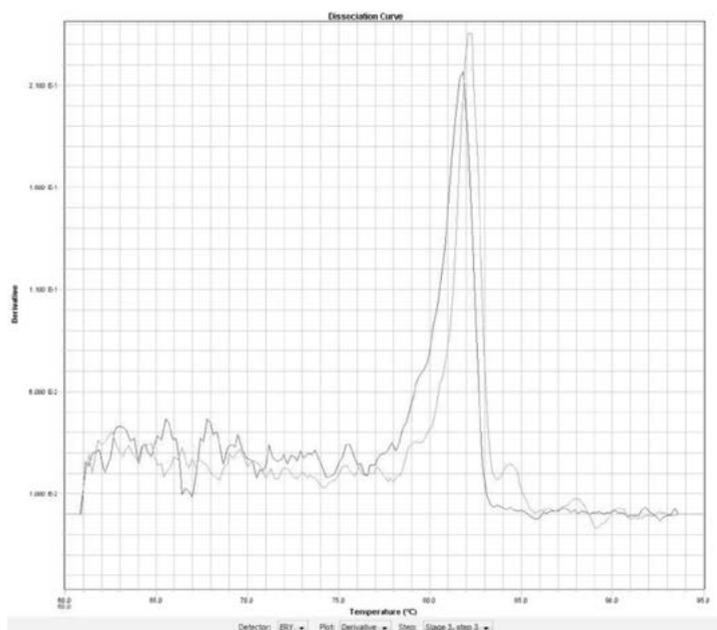


Figura 1. Confronto tra le curve di dissociazione del campione 992 e del controllo positivo. Il picco più basso corrisponde al campione 992, mentre l'altro al controllo positivo. Si può notare come siano quasi sovrapponibili.

Figure 1. Comparison between curve of dissociation of 992 sample and positive control. The lowest spike belongs to sample number 992, the other one represents the positive control. The two spikes are very close.

Dei 90 campioni di sangue testati con il kit CIVITEST®SUIS SE/MR 8 risultano positivi, mentre utilizzando il kit INGEZIM MAL ROJO® 4/90 risultano positivi e 2/90 risultano “dubbi”, in quanto presentavano un valore di densità ottica (lettura a 405 nm) compreso tra il *cut-off* negativo e quello positivo, come riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Risultati della ricerca sierologica mediante i due kit commerciali ELISA. (N. Numero, Pos. Positività).

Table 2. Results of antibody screening with two ELISA kits. (N. Number, Pos. Positive).

Allevamento	N. suini	N. campioni sangue	Pos. CIVITEST®	Pos. INGEZIM®
A	23	23	0	0
B	7	7	0	0
C	23	23	8	4(2)*
D	15	15	0	0
E	15	15	0	0
F	7	7	0	0
Totale	90	90	8	4(2)*

* “campioni dubbi”, “uncertain samples”

Da notare che le positività osservate sia a livello molecolare sia sierologico coinvolgono suini appartenenti allo stesso allevamento.

DISCUSSIONI

Il sistema di ricerca molecolare adottato per questa indagine preliminare ha dimostrato essere un metodo diagnostico valido specialmente per i vantaggi che possiede: risultati in breve tempo, specificità e sensibilità elevate. Tuttavia il saggio di PCR ha lo svantaggio di amplificare la sequenza di DNA presente non dimostrando se il microrganismo sia attivo e in grado di duplicarsi. Per questo motivo, l'indagine molecolare può essere affiancata dalla metodica microbiologica tradizionale, considerandola come un supporto all'eventuale positività riscontrata in PCR. Dopo l'amplificazione, infatti, il prearricchito positivo derivante dal campione 992 è stato sottoposto alla metodica microbiologica tradizionale. Nelle piastre di TSA Colavita e di agar sangue si sono osservate diverse colonie, ma nessuna con la morfologia tipica di *E. rhusiopathiae*. Questo deriva dal fatto che il protocollo di PCR identifica come positivo il DNA batterico, ma, esso potrebbe essere stato non vitale e quindi incapace di duplicarsi in coltura. Tale campione corrisponde alla *spongebag* strofinata su cute dopo che la carcassa ha subito il processo di rimozione delle setole tramite trattamento termico e questo potrebbe essere all'origine dell'inattivazione del microrganismo.

Le matrici utilizzate in questo studio sono state le *spongebag* strofinate sulla cotenna e le feci. Queste hanno un duplice vantaggio di essere facilmente reperibili, a differenza di un'altra matrice ampiamente utilizzata in letteratura come le tonsille, considerando il fattore campionamento e di costituire potenziali fonti di infezione zoonosica per gli operatori e di contaminazione dei luoghi di lavoro, considerando i fattori di rischio in sanità pubblica e sicurezza alimentare. Il ritrovamento di *E. rhusiopathiae* sulla cute non permette di definire lo stato di portatore nel soggetto campionato, in quanto si potrebbe trattare di un semplice contaminante ambientale; al contrario ritrovarlo nelle feci da un punto di vista epidemiologico ha una valenza maggiore in quanto il microrganismo può essere trasmesso tramite gli escrementi.

La ricerca sierologica è stata un utile supporto all'indagine diretta in quanto il ritrovamento di anticorpi nel medesimo allevamento ha confermato la circolazione del microrganismo, a livello di gruppo fornendo al contempo una visione generalizzata dello stato epidemiologico degli allevamenti esaminati. Sebbene sia presente una lieve discordanza tra i due kit, tali dati sono allineati con il riscontro PCR. Inoltre la limitatezza delle osservazioni effettuate nel presente studio non consente né una verifica di quanto dichiarato dalle ditte produttrici riguardo alla sensibilità e specificità dei test né una valutazione della loro concordanza. Tuttavia, quantomeno, il dato è univoco ed allineato con il riscontro PCR.

CONCLUSIONI

La maggior parte dei campioni è risultato negativo e questo permette di ipotizzare che *E. rhusiopathiae* sia poco presente all'interno del patrimonio suinicolo territoriale. Tale elemento potrebbe essere spiegato dal sistema di allevamento adottato da parte delle aziende analizzate. Il sistema d'allevamento intensivo, utilizzato dalle stesse, con le correlate misure di profilassi diretta e lo scarso contatto con *reservoir* selvatici e vettori quali roditori e uccelli può in parte spiegare la scarsa presenza di *E. rhusiopathiae* all'interno delle partite analizzate in questo studio. I dati raccolti non sono sufficienti per riportare la prevalenza di tale microrganismo, ma comunque possono essere utili come indagine preliminare per definire un protocollo di ricerca approfondita. Possiamo desumere che *E. rhusiopathiae* sia scarsamente presente negli allevamenti suini intensivi del territorio, ma per avere una conferma di tale affermazione sono necessari ulteriori ricerche.

In conclusione *E. rhusiopathiae* è un agente di zoonosi e pertanto non può essere trascurato il suo impatto sulla sanità pubblica e sulla salute umana. Uno studio sulla sua prevalenza all'interno del patrimonio suinicolo territoriale porterebbe a dei vantaggi *in primis* sulla conoscenza della situazione epidemiologica, ma soprattutto sul controllo nei confronti del microrganismo.

BIBLIOGRAFIA

- Brooke, C. J., & Riley, T. V. (1999). Erysipelothrix rhusiopathiae: Bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J. Med. Microbiol.*, 48(9), 789–799.
- Clark, A. E. (2015). The Occupational Opportunist: An Update on Erysipelothrix rhusiopathiae Infection, Disease Pathogenesis, and Microbiology. *Clin. Microbiol. Newsletter*, 37(18), 143–151.
- Colavita, G., Vergara, A., & Ianieri, A. (2006). Deferment of slaughtering in swine affected by cutaneous erysipelas. *Meat Sci.*, 72(2), 203–205.
- Craig, L. E., Dittmer, K. E., & Thompson, K. G. (2016). Chapter 2 – Bones and Joints. In *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1* (6 th, pp. 16– 163). Saunders.
- 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.
- Reboli, A. C., & Farrar, W. E. (1989). Erysipelothrix rhusiopathiae: An occupational pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2(4), 354–359.
- Takeshi, K., Makino, S., Ikeda, T., Nakashiro, A., Nakanishi, K., Katoh, Y., & Sunagawa, H. (1999). Direct and Rapid Detection by PCR of Erysipelothrix sp. DNAs Prepared from Bacterial Strains and Animal Tissues, *J.clin. Microbiol.* 37(12), 4093–4098.
- Wang, Q., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2010). Erysipelothrix rhusiopathiae. *Vet. Microbiol.*, 140(3–4), 405–417.