



Identification de biomarqueurs de contamination des camions de transport de porcs

Mireille LE DIMNA (1), Isabelle CORRÉGÉ (2), Romain RICHARD (2), Charlie CADOR (3),
Yannick BLANCHARD (4), Olivier BOURRY (1)

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Virologie Immunologie Porcines, Zoopôle, BP 53,
22440 Ploufragan, France

(2) IFIP, boulevard du Trieux, 35740 Pacé, France

(3) Cooperl Innovation SAS, 1 rue de la gare, 22640 Plestan, France

(4) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Génétique Virale et Biosécurité, Zoopôle, BP 53,
22440 Ploufragan, France

olivier.bourry@anses.fr

Identification of contamination biomarkers in pig transport lorries

Transporting pigs is a major risk for the introduction or spread of diseases such as African Swine Fever in France. In terms of food safety, animal transport is also likely to influence the transmission of food-borne zoonotic agents such as the hepatitis E virus or *Salmonella*. The aim of this study was to identify bacterial and viral biomarkers of contamination in pig transport lorries. The decrease in or disappearance of these biomarkers would verify the effectiveness of lorry cleaning and disinfection (C/D). First, swab samples were taken from the loading ramps of 100 lorries in two slaughterhouses before C/D. The samples were analysed by Next Generation Sequencing (NGS) to identify the bacterial and viral agents present. PCRs were performed to confirm the NGS results and those from the literature. New samples were taken from eight lorries before and after C/D to assess the relevance of the biomarkers identified. The NGS results revealed that bacteria were detected the most, while viral agents were detected rarely. According to the PCR, however, the genomes of circovirus, porcine adenovirus (PAdV) and teschovirus were detected in 100% of the samples, as were 4 bacterial agents (*Clostridium*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis* and *Mycoplasma*). In a second series of analyses, PAdV, *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma*, *Clostridium* and *E. coli* were always detected before C/D and in 30-95% of samples after C/D, making these pathogens potential biomarkers for validating the C/D of lorries after transporting pigs.

INTRODUCTION

Les transports de porcs représentent un risque important d'introduction ou de propagation de maladies telles que la Peste Porcine Africaine sur notre territoire (Cheng et Ward, 2022). En termes de sécurité sanitaire, le transport d'animaux est susceptible de jouer également un rôle dans la transmission d'agents zoonotiques alimentaires tels que le virus de l'hépatite E ou les salmonelles. L'objectif de cette étude est d'identifier des biomarqueurs bactériens et viraux de contamination des camions de transport de porcs omniprésents. La diminution ou la disparition de ces biomarqueurs pourrait permettre de vérifier l'efficacité du nettoyage et de la désinfection (N/D) des camions.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Prélèvement et préparation des échantillons

Dans un premier temps, une cartographie des agents viraux et bactériens présents dans tous les camions avant nettoyage a été réalisée. Des chiffonnettes (Sodibox®) ont été utilisées pour effectuer des prélèvements sur la rampe de déchargement de 100 camions dans deux abattoirs avant N/D. Dans un second temps, afin de vérifier l'abattement (lié au N/D) des agents

microbiens identifiés lors de la première phase, trois zones de huit camions ont été prélevées à l'aide des mêmes chiffonnettes : la rampe de déchargement, le sol et une cloison de séparation, ceci avant et après N/D. Les chiffonnettes ont été transférées au laboratoire dans les meilleurs délais, à 4 °C pendant le transport. Au laboratoire, 10 ml de PBS (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés dans chaque sac. La chiffonnette a été malaxée manuellement et un volume de 7-9 ml de surnageant a été récupéré dans un tube.

1.2. Analyses mises en œuvre

Une extraction d'acides nucléiques a été réalisée sur l'ensemble des 100 échantillons avec le kit NucleoMag® VET (Macherey Nagel), les ADN et ARN dosés, et des pools équimolaires de 10 échantillons ont été constitués pour la première série de prélèvement. Le séquençage NGS (IonProton - lifeTechnologies) a été réalisé sur les 10 pools de prélèvement en ADN et en ARN afin d'identifier des bactéries et des virus à tropisme respiratoire et digestif. A partir des résultats de NGS et de la bibliographie, des tests PCR sur les 10 pools de surnageant de chiffonnettes ont été réalisés pour vérifier la présence de génome des virus et bactéries. Les tests PCR utilisés ont été adaptés à partir de méthodes décrites dans la littérature ou de tests commerciaux. Ces agents biologiques testés sont les

circovirus de type 1 à 4 (Chen *et al.*, 2021), le rotavirus (Theuns *et al.*, 2014), le virus porcin de l’Influenza A (Adiagene) ; l’influenza C (Henritzi *et al.*, 2019), l’hépatite E (HEV) (Barnaud *et al.*, 2012), le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) (Adiagene), l’adenovirus porcin (PAdV) (Hundesa *et al.*, 2009), le teschovirus porcin (PTV) (Jones et Muehlhauser, 2015), le parvovirus (PPV) (ThermoFisher), les Clostridium (9 spp) (ADNucleis), les Mycoplasmes (67 spp) (Minerva Biolabs), *E. coli* (Furet *et al.*, 2009) et *Lawsonia intracellularis* (Biosellal).

2. RESULTATS

2.1. Identification de biomarqueurs omniprésents par NGS

Le séquençage a permis d’obtenir 20 millions de Reads par pool. De façon générale, la proportion de virus, est très faible (0,1 %). Les bactéries représentent environ 40 % des agents biologiques détectés. L’essentiel des Reads concerne les eucaryotes. L’analyse des Reads par pool de 10 chiffonnettes a permis de mettre en évidence que les résultats sont homogènes d’un pool à l’autre, que les virus sont très peu présents et que les *Circoviridae*, les *Parvoviridae* et les *Orthomyxoviridae* sont les familles de virus les plus représentées.

Tableau 1 – Résultats des PCR sur les pools de 10 chiffonnettes réalisées avant N/D

Agents biologiques recherchés par PCR dans les pools de 10	Pourcentage de détection
Circovirus	100
Rotavirus	30
Influenza A porcin	10
Influenza C	0
Hépatite E	80
SDRP ¹	0
Adenovirus porcin	100
Teschovirus porcin	100
Parvovirus	90
<i>E. coli</i>	100
<i>Lawsonia intracellularis</i>	100
<i>Mycoplasma spp.</i>	100
<i>Clostridium spp.</i>	100

¹ SDRP : virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin

Au niveau bactérien, les clostridies, *Lawsonia intracellularis*, *Escherichia coli* et les mycoplasmes sont les plus retrouvés.

2.2. Confirmation des biomarqueurs omniprésents par PCR

L’analyse par PCR des 10 pools de 10 chiffonnettes a permis d’identifier sept biomarqueurs présents dans 100 % des camions prélevés (Tableau 1). Chacun des sept agents biologiques détectés dans 100 % des pools, ont été recherchés par PCR dans les 100 prélèvements individuels. Les résultats individuels ont tous été positifs. Ces sept agents biologiques ont été retenus pour la deuxième partie de l’étude dans laquelle le niveau d’abattement de ces biomarqueurs a été analysé sur 24 prélèvements réalisés avant et après N/D.

Les acides nucléiques obtenus ont été analysés par PCR dans les mêmes conditions que dans la première partie. La figure 2 permet de visualiser l’abattement pour chaque biomarqueur.

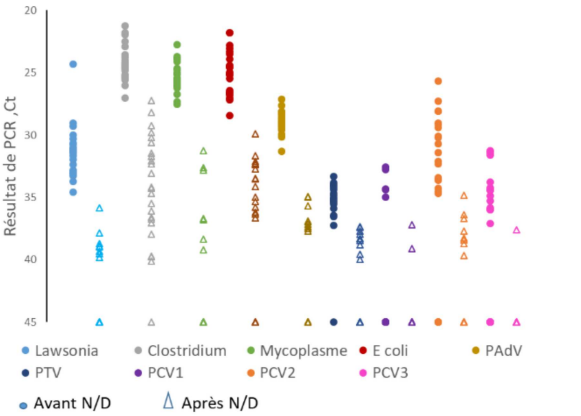


Figure 2 – Détection des biomarqueurs avant et après N/D

CONCLUSION

Au cours de la deuxième série d’analyses, PAdV, *L. intracellularis*, les mycoplasmes, les clostridium et *E. coli* ont été détectés systématiquement avant et entre 30 et 95 % des échantillons après N/D ; faisant ainsi de ces pathogènes de potentiels biomarqueurs pour valider le N/D des camions après le transport de porcs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la région Bretagne pour le financement de cette étude ainsi que les entreprises (Cooperl, Socopa, Eureden) qui ont participé à l’étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barnaud E., Rogee S., Garry P., Rose N., Pavio N., 2012. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol*, 78, 5153-5159.

Chen N., Xiao Y., Li X., Li S., Xie N., Yan X., Li X., Zhu J., 2021. Development and application of a quadruplex real-time PCR assay for differential detection of porcine circoviruses (PCV1 to PCV4) in Jiangsu province of China from 2016 to 2020. *Transbound Emerg Dis*, 68, 1615-1624.

Cheng J., Ward M.P., 2022. Risk factors for the spread of African Swine Fever in China: A systematic review of Chinese-language literature. *Transbound Emerg Dis*, 69, e1289-e1298.

Furet J.P., Firmesse O., Gourmelon M., Bridonneau C., Tap J., Mondot S., Dore J., Corthier G., 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol*, 68, 351-362.

Henritzi D., Hoffmann B., Wacheck S., Pesch S., Herrler G., Beer M., Harder T.C., 2019. A newly developed tetraplex real-time RT-PCR for simultaneous screening of influenza virus types A, B, C and D. *Influenza Other Respir Viruses*, 13, 71-82.

Hundesa A., Maluquer de Motes C., Albinana-Gimenez N., Rodriguez-Manzano J., Bofill-Mas S., Sunen E., Rosina Girones R., 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods*, 158, 130-135.

Jones T.H., Muehlhauser V., 2015. Survival of Porcine teschovirus as a surrogate virus on pork chops during storage at 2 degrees C. *Int J Food Microbiol*, 194, 21-24.

Theuns S., Desmarests L.M., Heylen E., Zeller M., Dedeurwaerder A., Roukaerts I.D., Van Ranst M., Matthijnsens J., Nauwynck H.J., 2014. Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. *Vet Microbiol*, 172, 23-34.