

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E PROFILI DI  
ANTIMICROBICO-RESISTENZA DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS  
SUIS* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA NEL  
PERIODO 2013 - 2020**

***MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL  
RESISTANCE PROFILES OF  
STREPTOCOCCUS SUIS STRAINS ISOLATED FROM FARMS IN  
NORTHERN ITALY IN 2013 - 2020***

TONNI M.<sup>1</sup>, FORMENTI N.<sup>1</sup>, GUARNERI F.<sup>1</sup>, ROMEO C.<sup>2</sup>, GUADAGNO F.<sup>1</sup>,  
SCALI F.<sup>1</sup>, ROTA NODARI S.<sup>1</sup>, BANO L.<sup>3</sup>, BACCHIN C.<sup>3</sup>, MAISANO A.M.<sup>1</sup>,  
VEZZOLI F.<sup>1</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>1</sup>, SANTUCCI G.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>, ZOPPI S.<sup>4</sup>,  
PASQUALI P.<sup>5</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna

<sup>2</sup> Università di Parma

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta

<sup>5</sup> Istituto Superiore di Sanità

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, caratterizzazione molecolare, antimicrobico-resistenza  
**Key words:** *Streptococcus suis*, molecular characterization, antimicrobial resistance

**RIASSUNTO**

Lo studio ha coinvolto 415 ceppi di *Streptococcus suis* isolati nel periodo 2013–2020 in allevamenti del Nord Italia. I ceppi sono stati testati mediante PCR per i biotipi capsulari 1, 2, 7 e 9 e per i fattori di patogenicità mrp, sly e epf. Gli stessi fattori sono stati testati con PFGE sui campioni di 4 allevamenti. La sensibilità a 11 antimicrobici è stata investigata tramite diffusione in agar. I sierotipi in ordine di prevalenza sono stati il 9 (49.7%), 2 (41.3%), 1 (4.9%) e 7 (4.2%). Sly è stato il fattore di patogenicità più frequente (85.7%), seguito da mrp (64.2%) ed epf (4.8%). Sly è stato riscontrato più frequentemente nel sierotipo 9. In 19 aziende erano disponibili almeno 4 isolati, su cui sono stati riscontrati 18 pattern di patogenicità. Solamente in 2 delle 19 è stato isolato sempre lo stesso pattern negli anni. La PFGE ha individuato un cluster prevalente nelle 4 aziende testate. I risultati suggeriscono un'elevata variabilità e una continua evoluzione. I ceppi analizzati sono risultati maggiormente sensibili ad amoxicillina + acido clavulanico (96.7%), amoxicillina (90.9%), ampicillina (78.6%), ceftiofur (77.7%) e florfenicolo (75.6%). La suscettibilità è stata costante negli anni, tuttavia, considerando le criticità italiane sull'uso degli antimicrobici, tale terapia andrebbe impiegata solo in fase emergenziale. In conclusione, la variabilità dei ceppi circolanti ne suggerisce un monitoraggio continuo, fondamentale nei casi in cui vengono utilizzati vaccini stabulogeni.

**ABSTRACT**

The study involved 415 *Streptococcus suis* strains, isolated during 2013–2020, from heavy pig farms in Northern Italy. The strains were tested with PCR for capsular biotypes (1, 2, 7, 9) and major virulence factors (mrp, sly, epf). The same virulence factors were examined with PFGE on 34 strains from four farms. Susceptibility to 11 antimicrobials was investigated by agar diffusion. Serotypes in order of prevalence were 9 (49.7%), 2 (41.3%),

1 (4.9%) and 7 (4.2%). Sly was the most common virulence factor (85.7%), followed by mrp (64.2%) and epf (4.8%). Sly was found most frequently in serotype 9. Overall, 18 patterns of pathogenicity were found in the 19 farms where, at least, four isolates were available. In two out of 19 farms a single pattern was isolated over the years. The PFGE identified one prevalent cluster in the four farms investigated. Such results suggest high variability and continuous changes of *S. suis* strains. The isolates were mostly susceptible to amoxicillin + clavulanic acid (96.7%), amoxicillin (90.9%), ampicillin (78.6%), ceftiofur (77.7%) and florfenicol (75.6%). Susceptibility has been constant over the years but, considering the well-known Italian issues regarding the overuse of antimicrobials, such therapy should only be considered when it is the only viable alternative. In conclusion, a continuous monitoring of serotypes and virulence factors is suggested by the large variability of *S. suis* strains, especially when autogenous vaccines are used.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* (*S. suis*) è considerato uno dei patogeni maggiormente rilevanti per l'economia dell'industria suinicola globale (Segura et al., 2020). La presenza di *S. suis* è stata riportata in tutto il mondo sia nell'allevamento intensivo che in quello estensivo. Inoltre, negli ultimi anni si è verificato un preoccupante aumento delle zoonosi causate da questo patogeno, soprattutto in alcune aree geografiche, testimoniato anche dall'incremento della relativa letteratura scientifica (Goyette-Desjardins et al., 2014). Il controllo delle infezioni da *S. suis* effettuato tramite l'utilizzo degli antimicrobici può avere delle implicazioni negative sull'antimicrobico-resistenza mentre sul successo della profilassi vaccinale sono riportate esperienze varie (Coursaut et al., 2020).

Ad oggi, in bibliografia sono riportati 35 sierotipi diversi di *S. suis*, tuttavia, alcuni di questi sono stati di recente tassonomicamente riclassificati dalla biologia molecolare in altre specie batteriche (Gottschalk and Segura, 2019). La classificazione sierologica si basa sulla identificazione degli antigeni capsulari (cps) specifici per ogni sierotipo. Un altro target specifico di identificazione del patogeno, da utilizzare in concomitanza con cps, per l'identificazione discriminante di *S.suis* è il gene della glutammato deidrogenasi (gdh), regione genomica molto conservata (Okwumabua et al., 2003). La caratterizzazione degli isolati, oltre che dal punto di vista del sierotipo, avviene anche tramite l'identificazione dei fattori di virulenza. I più conosciuti e studiati sono due: la sulsilina (sly), l'unica tossina prodotta da *S. suis* ed implicata anche nella adesione all'epitelio respiratorio, e la proteina rilasciata dalla muramidasi mistica (mrp) che è stata definita come "marker" di virulenza (Segura et al., 2017). Discorso a se merita la sostanza polimerica extracellulare (epf) coinvolta in molteplici meccanismi regolatori che recentemente è stata associata a meccanismi di resistenza agli antimicrobici, esacerbando quindi il fenomeno della antimicrobico-resistenza (Yi et al., 2020).

L'utilizzo di vaccini stabulogeni e la terapia antimicrobica sono i due presidi di controllo di *S.suis* a disposizione per il controllo della malattia oltre alle pratiche gestionali. Nel primo caso, per allestire la tipologia di vaccino è fondamentale conoscere il ceppo o i ceppi circolanti in allevamento (Hatrongjit et al., 2020). Tale conoscenza deve essere costantemente aggiornata per adeguare il presidio immunizzante dei ceppi vaccinali a quelli realmente circolanti in campo, selezionati dalla pressione ambientale e da quella vaccinale (Coursaut et al., 2020). Nel caso invece della terapia antimicrobica, l'efficacia della stessa è commisurata al tipo di principio attivo scelto in relazione alla sensibilità dell'isolato e alla corretta modalità di somministrazione. Secondo quanto descritto in letteratura, la sensibilità dei ceppi di *S. suis* isolati in Nord Italia non ha mostrato variazioni significative nel corso degli anni (Luppi et al., 2016).

Lo scopo del presente lavoro è quello di analizzare la prevalenza e la distribuzione dei sierotipi e dei fattori di patogenicità dei ceppi di *S. suis* circolanti in Nord Italia negli anni 2013-2020. Altro importante target del presente lavoro è quello di verificare la sensibilità ai principali antimicrobici utilizzati nella terapia della streptococcosi del suino.

## **MATERIALI E METODI**

### **Descrizione del campione**

Quattrocento-quin dici ceppi di *S. suis* sono stati isolati da altrettanti campioni patologici, cervello e polmone, di suini con forma clinica conferiti alle Sezioni Territoriali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna durante il periodo compreso tra il 2013 e il 2020.

I ceppi isolati sono stati testati per valutare la sensibilità agli antimicrobici e successivamente sono sottoposti ad indagini di biologia molecolare al fine di caratterizzarne sia il sierotipo, e quindi ad identificare le porzioni genomiche codificanti gli antigeni capsulari, che le proteine coinvolte nei meccanismi di patogenicità.

All'interno di una strategia di controllo elaborata dal Medico Veterinario aziendale, 19 allevamenti dal 2013 al 2020 hanno conferito almeno 4 campioni da cui è stato isolato *S. suis* al fine di valutare i diversi pattern circolanti nelle diverse aziende. Nove di questi allevamenti sono stati seguiti con continuità temporale, operando un maggiore sforzo diagnostico finalizzato all'identificazione dei ceppi circolanti, utili alla formulazione di un vaccino stabulogeno. La caratterizzazione dell'intero genoma tramite PGFE è stata eseguita invece su 34 ceppi isolati da cervello provenienti da quattro allevamenti.

### **Indagini di laboratorio**

Gli isolati di *S. suis* sono stati ottenuti procedendo con la semina dei campioni patologici su terreno agar sangue con incubazione in termostato a  $37 \pm 3^\circ\text{C}$  e lettura a 24 e 48 ore. L'identificazione del genere batterico è avvenuta tramite valutazione morfologica delle colonie e successive prove di identificazione con metodi biochimici miniaturizzati Api® 20Stre.

La caratterizzazione molecolare è stata eseguita sottoponendo gli isolati batterici dapprima all'estrazione del DNA totale tramite shock termico (lisi-bollitura) e successivamente alla PCR per l'identificazione del sierotipo e dei fattori di virulenza. L'utilizzo di una PCR multiplex amplificante le aree genomiche che codificano i geni, *gdh*, *sly*, *mrp* ed *epf* come proposto da Silva e colleghi (Silva et al., 2006) ha permesso di eseguire l'attribuzione del sierotipo e l'identificazione dei fattori di patogenicità.

La PFGE è stata condotta applicando protocolli precedentemente pubblicati (Vela et al., 2003). La similarità tra i ceppi ottenuti è stata studiata impiegando il software Bionumerics versione 7.6 (Applied Maths). Tale software permette di costruire un dendrogramma sulla base delle similarità tra i pulstipi, che viene calcolata utilizzando il Dice similarity coefficient. Come algoritmo di clustering è stato utilizzato l'UPGMA con una tolleranza e ottimizzazione dell'1,5%.

La sensibilità agli antibiotici è stata valutata tramite la metodica della diffusione in agar (CLSI\_VET, 2018) e testando un pannello di 11 molecole antimicrobiche: penicillina (P), amoxicillina (AML), ampicillina (AMP), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), cefalotina (KF), ceftiofur (EF), eritromicina (E), tetraciclina (TE), trimetoprim + sulfonamidi (SXT), florfenicolo (FFC), enrofloxacin (ENR). Dal 2017 al 2020 sono stati utilizzati tutti gli 11 antibiotici mentre solamente 3 di questi (AMC, EF, ENR) sono stati testati dal 2013 al 2016. L'interpretazione dell'antibiogramma secondo le regole del

CLSI VET 08 (CLSI\_VET\_08), ha consentito di classificare i ceppi di *S.suis* testati come sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R). Nell'elaborazione dei risultati gli intermedi sono stati considerati come resistenti (Luppi et al., 2016).

### Analisi statistica

La relazione tra ciascun sierotipo (variabile dipendente) e la presenza dei relativi fattori di virulenza sly, mrp ed epf (variabili indipendenti) è stata analizzata tramite regressione logistica. La sensibilità agli antibiotici è stata calcolata in base al periodo considerato come rapporto tra il numero di isolati di *S. suis* sensibili ad un determinato antibiotico ed il numero totale di isolati testati. L'andamento della sensibilità agli antimicrobici nel tempo è stata analizzata tramite regressione logistica in cui la variabile dipendente "sensibilità/resistenza" ad un determinato antibiotico è stata messa in relazione con gli anni di studio (2013-2020), variabile indipendente.

Le analisi statistiche sono state eseguite con il software SPSS 20.0 considerando statisticamente significativo il valore soglia di  $p < 0.05$ .

### RISULTATI

Anno dopo anno il numero di isolati di *S. suis* è andato progressivamente aumentando, così come il numero di ceppi isolati per allevamento conferente. I sierotipi rilevati nel corso degli anni di studio sono riportati nella Tabella 1. Seppur con percentuali diverse, quelli isolati maggiormente sono il sierotipo 2 e 9 mentre l'1 e il 7 sono stati rilevati meno frequentemente.

	cps1j	cps9h	cps2j	cps7h
<b>2013</b>	12,50%	75,00%	12,50%	0,00%
<b>2014</b>	0,00%	83,33%	16,67%	0,00%
<b>2015</b>	0,00%	22,22%	77,78%	0,00%
<b>2016</b>	8,33%	66,67%	16,67%	8,33%
<b>2017</b>	5,88%	64,71%	29,41%	0,00%
<b>2018</b>	4,00%	55,00%	37,00%	4,00%
<b>2019</b>	4,17%	39,58%	50,00%	6,25%
<b>2020</b>	6,10%	39,02%	50,00%	4,88%

**Tabella 1.** Prevalenza dei sierotipi di *S. suis* nel corso degli anni 2013-2020.

**Table 1.** Prevalence of the *S. suis* serotypes during 2013-2020 years.

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati delle indagini di caratterizzazione dei fattori di patogenicità dei ceppi isolati nei diversi anni. Considerando i due sierotipi maggiormente isolati, è stato constatato come sia più probabile rilevare isolati di sierotipo 9 con i fattori di patogenicità mrp e sly e isolati di sierotipo 2 con mrp ed epf. La distribuzione dei fattori di patogenicità per i relativi sierotipi è riportata in Tabella 3.

	mrp	epf	sly
2013	29,41%	5,88%	29,41%
2014	33,33%	0,00%	33,33%
2015	31,25%	6,25%	31,25%
2016	37,50%	0,00%	25,00%
2017	34,21%	0,00%	34,21%
2018	35,11%	0,00%	35,11%
2019	32,76%	1,72%	37,93%
2020	29,41%	3,53%	28,24%

**Tabella 2.** Prevalenza dei fattori di patogenicità tra gli isolati di *S. suis* nel corso degli anni 2013-2020.

**Table 2.** Prevalence of the virulence factors of *S. suis* isolated during 2013-2020 years.

	mrp	epf	sly
cps1j	33,33%	2,38%	33,33%
cps9h	35,03%	0,00%	34,75%
cps2j	32,55%	5,87%	31,09%
cps7h	42,11%	0,00%	15,79%

**Tabella 3.** Prevalenza dei fattori di patogenicità tra gli isolati di *S. suis* in relazione al sierotipo.

**Table 3.** Prevalence of the virulence factors of *S. suis* isolated in relation to serotype

Raggruppando i campioni in studio per allevamento conferente è emerso che 19 di questi hanno fornito materiale diagnostico da cui è stato isolato *S. suis* in almeno 4 campioni nel corso degli anni. In particolare, in nove di essi è stata riscontrata una certa continuità nel tempo (A, B, C, F, G, I, K, L e Q) frutto di isolamenti multipli nel corso degli anni. Una situazione peculiare è invece quella degli allevamenti A, B, F e I che oltre ad avere una continuità temporale mostrano un andamento simile tra loro: dopo isolamenti iniziali sporadici e discontinui si è incrementato il numero di ceppi isolati per ritornare gli anni successivi ad un numero più esiguo, rispondendo ad una precisa programmazione fatta a monte.

Basandosi sui risultati forniti dalla biologia molecolare in merito a sierotipo e fattori di virulenza sono stati rilevati 18 diversi pattern di *S. suis* circolanti nei 19 allevamenti sopra menzionati (Tabella 4). In alcuni casi si può vedere la presenza di un pattern predominante come negli allevamenti L: Cps2(gdh-mrp-epf-sly) e N: Cps2(gdh-mrp-sly) aventi un unico sierotipo e relativi fattori di patogenicità costanti, negli altri allevamenti invece i diversi pattern si succedono con combinazione di sierotipi e fattori di virulenza diversi (Tabella 3). In quest'ultimo caso si possono notare aziende con pattern diversi all'interno dello stesso sierotipo ma anche pattern diversi facenti capo a sierotipi diversi.

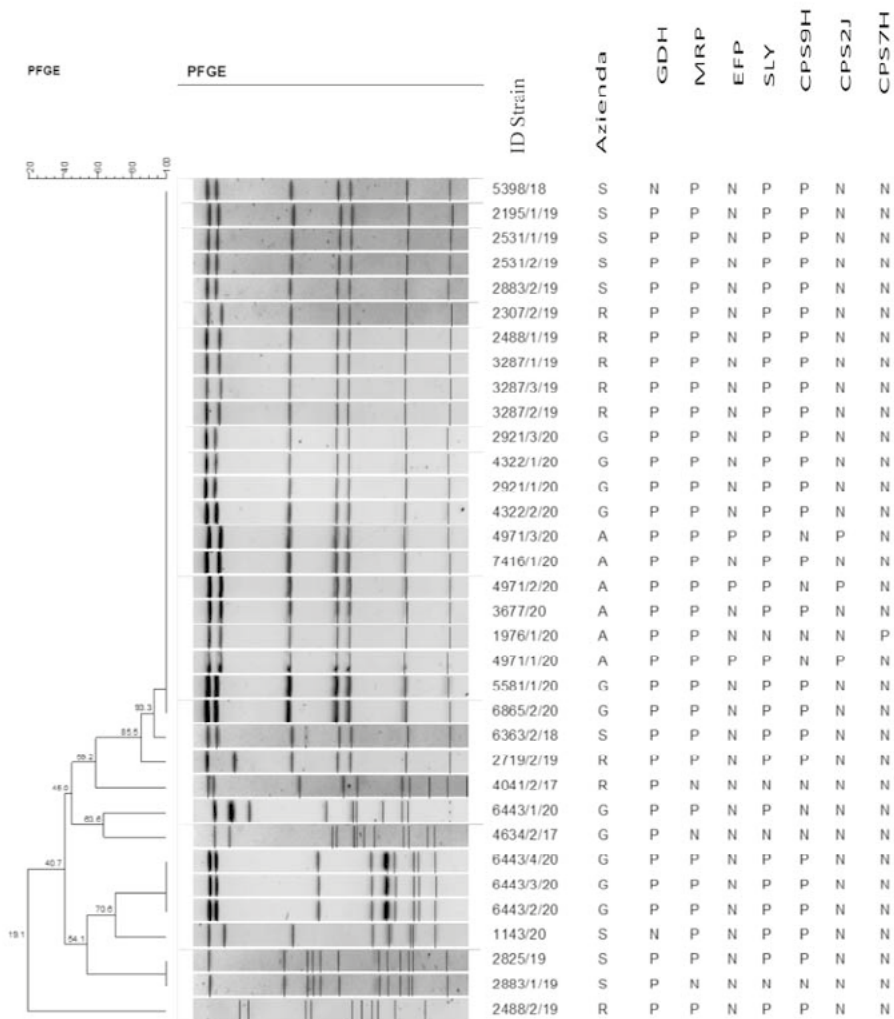
	Cps1(gdh-mrp-sly) (*)	Cps2(gdh) (*)	Cps2(gdh-mrp) (*)	Cps2(gdh-sly) (*)	Cps2(mrp-sly) (*)	Cps2(gdh-mrp-sly) (*)	Cps2(gdh-mrp-epf-sly) (*)	Cps9(gdh) (*)	Cps9(sly) (*)	Cps9(gdh-sly) (*)	Cps9(mrp-sly) (*)	Cps9(gdh-mrp) (*)	Cps9(gdh-mrp-sly) (*)	Cps7(gdh)w (*)	Cps7(mrp) (*)	Cps7(gdh-mrp) (*)	Cps7(gdh-sly) (*)	Cps7(gdh-mrp-sly) (*)
A				25.0	25.0								25.0				25.0	
B		11.1									11.1		77.8					
C						11.1					33.1		55.6					
D						57.1	14.3						28.6					
E						37.5		12.5	25.0				25.0					
F						50.0					25.0		25.0					
G						50.0							50.0					
H			33.3								22.1		33.3					11.2
I							42.8					14.3	28.6			14.3		
J													100					
K						37.5	12.5						50.0					
L							100											
M											25.0		75.0					
N						100												
O						16.7							83.3					
P											66.7			33.3				
Q	21.4					57.2							14.3			7.1		
R	9.0				36.4	54.6												
S				62.5				25.0							12.5			

**Tabella 4.** Pattern circolanti e relativa frequenza negli allevamenti con almeno 4 isolamenti di *S. suis* negli anni di studio. Con l'asterisco (\*) sono indicati i pattern che includevano la tossina sly.

**Table 4.** Pattern and frequency of *S. suis* isolated in farms with at least 4 isolation during the time of study.

With the asterisk (\*) the patterns that included the toxin (sly).

I risultati della PFGE evidenziano un cluster clonale (similarità del 100%) in cui si collocano 22 dei 34 ceppi analizzati, isolati dai 4 allevamenti indagati, in anni diversi (figura 1). Diciassette di questi presentano anche lo stesso pattern di virulenza. Inoltre, i ceppi isolati dal cervello di soggetti diversi di uno stesso allevamento, in uno stesso momento si sono dimostrati cloni.



**Figura 1.** Dendrogramma originato dai profili PFGE (SmaI) di 34 *S. suis* isolati da casi clinici in 4 diversi allevamenti (S, A, G, R).

**Figure 1.** Tree showing the similarities between PFGE patterns (SmaI) of 34 *S. suis* isolated from clinical cases in 4 different farms (S, A, G, R).

Il test di antimicrobico-suscettibilità ai più comuni antimicrobici (Tabella 5) ha rivelato una percentuale di sensibilità molto alta dei ceppi testati verso la AML, che arriva al 96.7% se in associazione con l'acido clavulanico (AMC). Percentuali di sensibilità di ben oltre il 70% dei ceppi testati anche verso AMP, EF e FFC, appena sotto sono risultati invece P e KF. L'aggiornamento del pannello di antibiotici utilizzati ha impedito che il numero di ceppi testati verso i vari antimicrobici fosse costante, ad eccezione della AML che è stata testata nella maggior parte dei casi in associazione all'acido clavulanico, meno in formulazione singola. L'analisi statistica ha evidenziato che la sensibilità dei ceppi di *S. suis* verso i singoli antibiotici è rimasta invariata nel corso degli anni in studio ( $p > 0.05$ ).

Antimicrobico	Abbreviazione	Ceppi testati	Sensibilità
Amoxicillina + Acido Clavulanico	AMC	330	96.7%
Amoxicillina	AML	66	90.9%
Ampicillina	AMP	266	78.6%
Ceftiofur	EF	332	77.7%
Florfenicolo	FFC	299	75.6%
Penicillina	P	266	67.3%
Cefalotina	KF	127	64.6%
Trimetoprim + Sulfonamidi	SXT	266	45.1%
Enrofloxacin	ENR	332	42.8%
Eritromicina	E	266	9.0%
Tetraciclina	TE	266	3.8%

**Tabella 5.** Numero di ceppi di *S.suis* considerati e relativa percentuale di sensibilità agli antibiotici testati.

**Table 5.** Number of *S.suis* strains and antimicrobial susceptibility.

## DISCUSSIONE

I risultati hanno evidenziato come i sierotipi maggiormente isolati siano stati il 2 ed il 9. Questo dato è in linea con quanto rilevato a livello internazionale, soprattutto se si considera che il sierotipo 2 è quello da sempre maggiormente diffuso a livello mondiale (Goyette-Desjardins et al., 2014) e che il sierotipo 9 ha assunto negli ultimi anni un maggior rilievo (Willemse et al., 2019). Quest'ultimo è stato oggetto di approfonditi studi genomici (Segura et al., 2020) che hanno evidenziato come i cloni responsabili di manifestazioni cliniche siano molto simili tra loro, a differenza di quelli rilevati in suini asintomatici che hanno caratteristiche genomiche più eterogenee.

Per quanto riguarda la caratterizzazione dei fattori di patogenicità è stato evidenziato che mentre *mrp* e *sly* sono state rilevate in modo omogeneo negli anni di studio, *epf* è stata rilevata solo in sporadici casi. Per contro non è stata osservata alcuna associazione tra i ceppi che esprimevano questo fattore di virulenza e la resistenza ad alcune classi di antibiotici, nonostante in bibliografia siano stati attribuiti fenomeni di antimicrobico-resistenza proprio a *epf* (Yi et al., 2020).

Le associazioni rilevate con maggior frequenza sono state: ceppi di *S. suis* sierotipo 9 che esprimono *mrp* e *sly* e ceppi di sierotipo 2 caratterizzati da *mrp* ed *epf*. Va sottolineato che *sly* risulta associata più frequentemente al sierotipo 9, a differenza di quanto riportato da altri autori che descrivono invece *sly* associata al sierotipo 2 (Segura et al., 2020). Ciò non stupisce se consideriamo che nei Paesi Bassi e nell'est Europa si è assistito negli ultimi anni ad un notevole aumento degli isolamenti di *S. suis* sierotipo 9, in particolar modo per quelli ad alta virulenza (Willemse et al., 2019), a conferma del fatto che questo sierotipo sta assumendo sempre più un ruolo di interesse. Va comunque ricordato che l'identificazione dei fattori di patogenicità, per ora, non può essere considerato come discriminante sull'effettivo risvolto clinico in campo di un determinato ceppo (Segura et al., 2020). L'espressione di tali fattori di patogenicità ha mostrato una distribuzione pressoché omogenea di *mrp* e *sly* nel corso degli anni in linea con quanto presente nella letteratura internazionale (Segura et al., 2017).

La combinazione di sierotipo e fattori di patogenicità ci ha portato ad identificare



diversi pattern di *S. suis*. Focalizzandosi sui singoli allevamenti che hanno effettuato un monitoraggio costante nel corso degli anni, i pattern rilevati sono risultati diversi e variabili, mostrando di fatto un equilibrio dinamico, che come già riportato in letteratura (Segura et al., 2020) necessita di essere seguito nel tempo. A conferma di questo sono anche i risultati di caratterizzazione genetica attraverso PFGE, che garantiscono un ulteriore step nella identificazione dei pattern presenti. Infatti i dati ottenuti dai 4 allevamenti in cui è stata eseguita anche questa analisi, mostrano un unico cluster clonale con diversi pattern di virulenza, in particolare i cloni isolati da soggetti aventi una clinica rilevante sono stati quelli dotati di tutti e tre i fattori di virulenza.

È emerso quindi che al fine di avere un quadro completo dei diversi pattern circolanti e controllare la malattia in un allevamento (anche attraverso l'utilizzo di vaccini stabulogeni), risulta importante conoscere la dinamica di circolazione dei diversi ceppi attraverso l'esecuzione di più isolamenti nel corso del tempo e la loro caratterizzazione. Tale caratterizzazione si realizza con l'identificazione dei pattern circolanti mediante metodica PCR e/o PFGE.

Per quanto riguarda la sensibilità dei ceppi di *S. suis* verso gli antibiotici considerati non sono state rilevate differenze statisticamente significative nel periodo di studio, confermando quanto rilevato nella decade precedente (2004-2014) (Luppi et al., 2016). Se osserviamo il dato complessivo dei ceppi testati nel corso degli anni, è emerso come AML, AMP, EF e FFC siano le molecole a cui *S. suis* risulta essere maggiormente sensibile, confermando il ruolo fondamentale di tali principi attivi per la terapia antimicrobica della streptococcosi suina. Tuttavia, questi dati devono essere soppesati nel contesto della logica "One Health" in cui alcune molecole ricoprono un ruolo prioritario nelle terapie umane. Inoltre, si rammenta come già alcune molecole (EF), rientrino in una categoria di antimicrobici il cui utilizzo deve essere razionalizzato e basato sui risultati di un test di sensibilità (Commission, 2015). A fronte di un ampio ventaglio di molecole idonee al trattamento antibiotico, questa soluzione deve essere contemplata unicamente come terapia riparatoria e non utilizzata nella quotidiana gestione aziendale.

Il management aziendale e la profilassi rappresentano la vera sfida moderna per il controllo delle infezioni da *S. suis* (Correa-Fiz et al., 2020). L'utilizzo degli antibiotici rimane giustificato dall'efficacia del trattamento per la risoluzione delle forme cliniche gravi e dalla sensibilità che storicamente *S. suis* ha dimostrato verso le sopraccitate classi di antimicrobici. È importante tuttavia, considerare il tema della farmaco-suscettibilità in quanto, seppur in Italia nel recente passato (Luppi et al., 2016) e nel nostro lavoro si è dimostrata costante, a livello mondiale viene riportata la progressiva diminuzione della sensibilità agli antimicrobici (Segura et al., 2020).

Le esperienze di altri paesi Europei hanno insegnato che controllare *S. suis* senza l'utilizzo di antimicrobici è difficile ma possibile. A tale fine è fondamentale l'applicazione di adeguate misure di management aziendale, l'utilizzo di additivi con azione diretta sul microbiota intestinale/nasale (Correa-Fiz et al., 2020) e l'impiego di vaccini stabulogeni (Hatrongjit et al., 2020). Seppur i dati scientifici relativi alla pratica vaccinale siano limitati, diversi studi hanno dimostrato che l'efficacia è prima di tutto influenzata dall'individuazione corretta dei pattern presenti nell'allevamento mediante più isolamenti nel corso del tempo (Coursaut et al., 2020; Segura et al., 2020).

## CONCLUSIONI

Il presente studio ha rilevato una notevole variabilità in termini di sierotipi circolanti di *S. suis* e dei relativi fattori di virulenza. I sierotipi 2 e 9 sono quelli isolati più di frequente e tra questi il sierotipo 9 esprime più spesso la tossina sly. I pattern più frequenti sono

risultati essere Cps2(gdh-mrp-sly) e Cps9(gdh-mrp-sly). Il pannello di sensibilità agli antimicrobici si è mostrato stabile nel tempo.

Il controllo della streptococcosi del suino non può prescindere da un adeguata strategia di management aziendale e deve prevedere, la valutazione di tecniche alternative fra le quali l'utilizzo di vaccini stabulogeni, oltre all'utilizzo degli antimicrobici per le forme cliniche gravi. Poiché il successo di tale vaccinazione è basata sulla corrispondenza tra ceppi circolanti e ceppi vaccinali, la determinazione dei pattern circolanti attraverso indagini di biologia molecolare risulta essere uno strumento basilare e di primaria importanza per il controllo della malattia. Il costante monitoraggio dei ceppi circolanti negli allevamenti ove vengono utilizzati tecniche immunizzanti consentirà un riscontro in merito alla loro efficacia e permetterà di conoscere meglio la dinamica di circolazione all'interno dei singoli allevamenti.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. CLSI\_VET, 2018, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition. Ed., Clinical and Laboratory Standards Institute 2018.
2. CLSI\_VET\_08, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2018.
3. Commission, E., 2015, Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C-299/04): Official Journal of the Euran Union, p. 1-20.
4. Correa-Fiz, F., C. Neila-Ibáñez, S. López-Soria, S. Napp, B. Martinez, L. Sobrevia, S. Tibble, V. Aragon, and L. Migura-Garcia, 2020, Feed additives for the control of post-weaning *Streptococcus suis* disease and the effect on the faecal and nasal microbiota: *Sci Rep*, v. 10, p. 20354.
5. Corsaut, L., M. Misener, P. Canning, G. Beauchamp, M. Gottschalk, and M. Segura, 2020, Field Study on the Immunological Response and Protective Effect of a Licensed Autogenous Vaccine to Control *Streptococcus suis* Infections in Post-Weaned Piglets: *Vaccines (Basel)*, v. 8.
6. Gottschalk, M., and M. Segura, 2019, *Diseases of Swine*: Hoboken, NJ, USA,, Wiley-Blackwell, 934-950 p.
7. Goyette-Desjardins, G., J. P. Auger, J. Xu, M. Segura, and M. Gottschalk, 2014, *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing: *Emerg Microbes Infect*, v. 3, p. e45.
8. Hatrongjit, R., N. Fittipaldi, M. Gottschalk, and A. Kerdsin, 2020, Tools forMolecular Epidemiology of *Streptococcus suis*: *Pathogens*, v. 9.
9. Luppi, A., P. Bonilauri, G. Maioli, Y. Gherpelli, and M. Dottori, 2016, Resistenza agli antibiotici in ceppi di *Streptococcus suis* isolati nel suino nel periodo 2004-2014: XLII Meeting Annuale, p. 133-137.
10. Okwumabua, O., M. O'Connor, and E. Shull, 2003, A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase: *FEMS Microbiol Lett*, v. 218, p. 79-84.
11. Segura, M., V. Aragon, S. L. Brockmeier, C. Gebhart, A. Greeff, A. Kerdsin, M. A. O'Dea, M. Okura, M. Saléry, C. Schultsz, P. Valentin-Weigand, L. A. Weinert, J. M. Wells, and M. Gottschalk, 2020, Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. suis*: *Pathogens*, v. 9.

12. Segura, M., N. Fittipaldi, C. Calzas, and M. Gottschalk, 2017, Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical?: *Trends Microbiol*, v. 25, p. 585-599.
13. Silva, L. M., C. G. Baums, T. Rehm, H. J. Wisselink, R. Goethe, and P. Valentin-Weigand, 2006, Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR: *Vet Microbiol*, v. 115, p. 117-27.
14. Vela, A. I., J. Goyache, C. Tarradas, I. Luque, A. Mateos, M. A. Moreno, C. Borge, J. A. Perea, L. Domínguez, and J. F. Fernández-Garayzábal, 2003, Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis: *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 2498-502.
15. Willemse, N., K. C. H. van der Ark, N. Stockhofe-Zurwieden, H. Smith, D. I. Picavet, C. van Solt-Smits, H. J. Wisselink, C. Schultsz, and A. de Greeff, 2019, Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations: *Sci Rep*, v. 9, p. 15429.
16. Yi, L., M. Jin, J. Li, D. Grenier, and Y. Wang, 2020, Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Streptococcus suis*: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 104, p. 8649-8660.