

STUDIO PRELIMINARE PER LA CREAZIONE DI UNA FILIERA DI SUINI ANTIBIOTIC-FREE: MONITORAGGIO DEGLI AGENTI BATTERICI E VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA

PRELIMINARY STUDY FOR THE CREATION OF AN ANTIBIOTIC-FREE PIG SUPPLY CHAIN: MONITORING OF BACTERIAL AGENTS AND ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

VALENTINI F.¹, CAPPUCCIO P.², CALISESI L.², LUPPI A.³, TOSI G.⁴, CHIUSI A.⁴,
RUSCELLI R.⁴, BERTASI B.⁵, MATTEI S.⁴, FIORENTINI L.⁴

¹ Veterinario libero professionista;

² Medico Veterinario, GESCO S.C.A.;

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Parma;

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Forlì;

⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia.

Parole chiave: antibiotic-free, post-svezzamento, patologie batteriche

Keywords: antibiotic-free, post-weaning, bacterial diseases

RIASSUNTO

La resistenza agli antimicrobici determina gravi rischi per la salute pubblica ed è caratterizzata da un impatto economico rilevante. Nella filiera suina, uno dei punti critici per l'insorgenza di resistenze negli animali e nei loro prodotti, è di fondamentale importanza promuovere l'uso razionale e consapevole del farmaco. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di monitorare la circolazione ed i livelli di antibiotico resistenza di alcuni agenti batterici patogeni e commensali (*Streptococcus suis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) isolati in un ciclo produttivo di suini (post-svezzamento), come studio preliminare per la creazione di una filiera *antibiotic free*. Nell'arco di 5 mesi, 89 carcasse sono state sottoposte ad esame necroscopico e raccolta di un panel di campioni con approccio sistematico. Su tutte le matrici è stato applicato un protocollo batteriologico standardizzato che ha portato all'isolamento di 40 ceppi di *S. suis*, 46 di *E. coli* e 28 di *S. aureus*. Tali ceppi sono stati caratterizzati con metodiche sierologiche e di biologia molecolare. I ceppi di *S. suis* e di *E. coli* sono stati inoltre testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici. I risultati dello studio confermano l'ampia diffusione dell'antimicrobico resistenza negli allevamenti suinicoli e mettono in evidenza alcune criticità riscontrate nel percorso di creazione di filiere *antibiotic free*, sottolineando la necessità un approccio olistico, in una logica di "One Health".

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) poses serious risks to public health and has a significant economic impact. In the pig supply chain, one of the critical points for the emergence of AMR in animals and their products, it is of fundamental importance to promote the rational and responsible use of drugs. The aim of this work was to monitor the circulation and antibiotic resistance levels of some pathogenic and commensal bacteria (*Streptococcus suis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) isolated in a pig production cycle (post-weaning), as a preliminary study for the creation

of an antibiotic free supply chain. Over a period of 5 months, the necroscopic examination of 89 carcasses was carried out and a panel of samples was collected from each carcass using a systematic approach. A standardised bacteriological protocol was applied to all samples, resulting in the isolation of 40 strains of *S. suis*, 46 of *E. coli* and 28 of *S. aureus*. These strains were characterised using serological and molecular methods. *S. suis* and *E. coli* strains were also tested for antimicrobial susceptibility. The results of the study confirm the wide spread of antimicrobial resistance in the pig farming system and highlight some weak points encountered in the creation of antibiotic free supply chains, thus emphasising the need for a holistic approach, in a “One Health” perspective.

INTRODUZIONE

Alcune previsioni su scala mondiale indicano che nel 2050 l'antimicrobico-resistenza (AMR) diventerà la principale causa di morte nell'uomo, con 10 milioni di decessi l'anno, ridurrà il PIL di 2-3,5 punti e determinerà un costo complessivo di 100 trilioni di dollari (Jim O'Neill, 2014) calling for ideas to bring this growing threat under control. This is the Review team's first paper, where we demonstrate that there could be profound health and macroeconomic consequences for the world, especially in emerging economies, if antimicrobial resistance (AMR. In Europa, negli ultimi anni, ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) ed EMA (European Medicines Agency) hanno: (i) messo in relazione il consumo di antibiotici con la frequenza di insorgenza di AMR nell'uomo e negli animali (ECDC, EFSA, EMA, 2015); (ii) fornito una serie di misure da mettere in atto per ridurre l'uso di antimicrobici negli animali e valutato il loro impatto sulle produzioni (EMA, EFSA, 2017); (iii) stabilito indicatori armonizzati, per la medicina umana e veterinaria, per il monitoraggio del consumo di antibiotici e la sorveglianza dell'AMR (ECDC, EFSA, EMA, 2017). In considerazione della gravità e dell'importanza di tale fenomeno, si sta cercando di intervenire a livello nazionale ed internazionale redigendo Action Plan e linee guida che promuovano la riduzione del consumo di antibiotici e un uso razionale e consapevole del farmaco, sia in campo umano che veterinario, in una logica di “One Health”, con un approccio olistico “from farm to fork”.

L'Italia è il secondo maggiore consumatore europeo di antibiotici ad uso veterinario (EMA, 2020). Il Ministero della Salute Italiano dal 2014 produce annualmente il “Piano di monitoraggio armonizzato sulla resistenza agli antimicrobici di batteri zoonotici e commensali” (Ministero della Salute e CRAN-AR, 2022) e ha avviato nel 2017 il Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) (Ministero della Salute, 2017). Quest'ultimo, rivolgendosi sia alla medicina umana che veterinaria si propone di ridurre la frequenza di infezioni causate da microrganismi AMR e la frequenza di infezioni associate ad ospedalizzazione e assistenza sanitaria. A questo scopo, gli obiettivi prefissati per il settore veterinario nel 2020 erano: (i) la riduzione almeno del 30% del consumo complessivo di antibiotico; (ii) la diminuzione di consumo di *Highest Priority Critically Important Antibiotics* (HPCIA) del 10% (WHO, 2018); (iii) la riduzione del consumo della colistina a livelli inferiori ai 5 mg/PCU (*Population Correction Unit*); (iv) la riduzione della somministrazione di antibiotici per via orale almeno del 30%.

Per far fronte a tali sfide sanitarie è necessario un approccio congiunto finalizzato ad un miglioramento delle condizioni di benessere e della biosicurezza degli allevamenti, nell'ottica più generale di un'implementazione degli aspetti preventivi delle malattie infettive, nonché ad un miglioramento delle capacità diagnostiche sia in campo che in laboratorio. Al di fuori di questo contesto e soprattutto per andare incontro alle richieste dei consumatori, oggi si sta assistendo anche allo sviluppo di filiere zootecniche *antibiotic free*.

La filiera suina, essendo uno dei punti critici per l'insorgenza di resistenze (sia in batteri zoonotici

che in patogeni opportunisti per l'uomo) negli animali e nei loro prodotti, deve affrontare il problema sensibilizzando tutti gli attori coinvolti, attivando piani di monitoraggio sul consumo di farmaco e sullo sviluppo di resistenze, incentivando studi finalizzati ad indagare le possibili soluzioni alle principali criticità riscontrate nel perseguimento di tale obiettivo (Diegoli et al., 2018).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di monitorare la circolazione ed i livelli di antibiotico resistenza di alcuni agenti batterici patogeni e commensali (*Streptococcus suis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) isolati in un ciclo produttivo di suini (post-svezzamento), come studio preliminare per la creazione di una filiera *antibiotic free*.

MATERIALI E METODI

Animali e allevamenti

L'area di studio del progetto è stata una "micro-filiera", all'interno della produzione suinicola di una azienda agroalimentare italiana, costituita dai cosiddetti controsessi (maschi esclusi dai circuiti DOP) e da femmine non selezionate per divenire riproduttori. Tali animali provengono da un allevamento di scrofe gran parentali (sito 1), organizzato in bande trisettimanali, con una produzione per banda destinata alla micro-filiera sopra descritta di circa 400 animali. Ad una età di 28 giorni (6-7 kg peso vivo) i lattoni vengono trasferiti nel sito 2, per essere successivamente accasati 65 giorni dopo (25-28 kg peso vivo) in un allevamento da ingrasso (sito 3), dove concludono il ciclo produttivo al raggiungimento del peso di macellazione.

Prelievo dei campioni

Il progetto è stato realizzato nell'arco di 5 mesi, da febbraio a luglio 2021. Nel rispetto degli obiettivi prefissati, l'attività di monitoraggio si è concentrata sull'allevamento ritenuto punto critico della micro-filiera in esame (sito 2), che è stato visitato con frequenza almeno settimanale. Gli altri due siti produttivi sono stati visitati due volte ciascuno.

Nel corso dello studio, ogni suinetto deceduto proveniente dal sito 2 è stato sottoposto ad un protocollo diagnostico standardizzato. In via preliminare, sono stati raccolti i dati relativi al segnalamento e all'anamnesi e sono stati osservati ed interpretati eventuali quadri clinici nel gruppo di appartenenza. Successivamente, entro 24 ore dalla morte, ogni carcassa in adeguato stato di conservazione è stata trasportata, nel rispetto delle buone norme su raccolta, conservazione e trasporto dei campioni biologici, al laboratorio di riferimento individuato (sede di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - IZSLER).

Esami necroscopici

Per ogni carcassa conferita è stato svolto un esame necroscopico con approccio sistematico ed è stato raccolto un panel di campioni standardizzato (amigdale, valvole cardiache, liquido cefalorachidiano, milza, polmoni (bronchi e pleura), linfonodi mesenterici, piccolo intestino, reni), a cui poteva essere associato il prelievo di altre matrici qualora fossero emersi quadri patologici ritenuti rilevanti.

Diagnostica batteriologica

Tutte le matrici raccolte sono state seminate sui terreni colturali Agar sangue (AG), Hektoean enteric agar (HE), Kanamycin Aesculin Azide agar (KAA) seguendo un protocollo standardizzato (Tabella 1). È stata inoltre svolta una ricerca sistematica di sostanze inibenti nei reni, tramite semina su terreno agarizzato Standard II, addizionato con spore di *Bacillus subtilis*. Le piastre sono state successivamente incubate in termostato a 37±1°C in condizioni di aerobiosi per 18-

24h. Eventuali matrici patologiche aggiuntive sono state processate secondo metodiche interne standardizzate.

Tabella 1. Protocollo microbiologico standardizzato in uso nel presente progetto.

Table 1. Standardised microbiological protocol used in the present study.

Matrice	Terreni culturali
Amigdale	AG, HE, KAA
Valvole cardiache	
Liquido cefalo-rachidiano	
Milza	
Bronchi	
Pleura	
Linfonodi mesenterici	AG, HE
Piccolo intestino	
Reni	Sostanze inibenti

Terminato il periodo di incubazione, è stata effettuata la lettura delle piastre e le colonie appartenenti ad agenti patogeni o commensali sono state trapiantate per poter eseguire successivi approfondimenti diagnostici. In particolare, considerando la loro primaria importanza come agenti patogeni in sito 2, è stato scelto di focalizzare l'attività nei confronti dei ceppi di *Streptococcus suis* e di *Escherichia coli*. Inoltre, è stata posta particolare attenzione verso i ceppi di *Staphylococcus aureus*, in quanto possibili portatori di geni codificanti per la resistenza alla meticillina, e quindi rilevanti per la salute umana.

Le colonie con morfologia riconducibile a *Streptococcus* spp. sono state sottoposte a colorazione di Gram, test dell'ossidasi e della catalasi. La conferma è avvenuta tramite la metodica di identificazione biochimica miniaturizzata Api® 20 Strep (bioMérieux). Le colonie che presentavano profilo corrispondente sono state in seguito inviate alla sede di Parma dell'IZSLER per l'esecuzione di metodiche di biologia molecolare (PCR Multiplex amplificante le aree genomiche che codificano per i geni *gdh*, *cps1*, *cps2*, *cps1/2*, *cps7* e *cps9*) per l'identificazione e caratterizzazione dei principali sierotipi di *S. suis* di interesse diagnostico: 1, 2, 7, 9. I ceppi di *S. suis* per cui non è stato possibile determinare il capsulotipo con tale metodica, sono stati sottoposti a caratterizzazione sierologica, tramite test di agglutinazione su vetrino, per l'identificazione dei sierotipi 4 e 5.

Le colonie con morfologia e colorazione di Gram riconducibile a *E. coli*, dopo la valutazione di eventuale alone emolitico su agar sangue, sono state sottoposte a prove biochimiche-enzimatiche mediante galleria miniaturizzata Microgen GN-ID (Novacyt Group). Le colonie che presentavano un profilo corrispondente sono state inviate alla sede di Brescia dell'IZSLER per l'esecuzione di analisi sierologiche e di biologia molecolare. La caratterizzazione sierologica, a livello di sierogruppo, è stata svolta mediante la tecnica di agglutinazione lenta a caldo, con l'impiego di 30 diversi antisieri O gruppo-specifici. La ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità è stata effettuata attraverso metodica PCR multiplex per i geni codificanti le fimbrie *F4*, *F5*, *F6*, *F18*, *F41*, le tossine termostabili *STa* e *STb*, la tossina termolabile *LT* e la tossina "shiga-like" *Stx2e*. I ceppi di *E. coli* sono stati classificati come enterotossigeni (ETEC) o come produttori di shiga-

tossine (STEC) in accordo con quanto riportato da Luppi et al. (2016b) due to *Escherichia coli*, is an important cause of economic losses to the pig industry primarily as a result of mortality and worsened productive performance. In spite of its relevance, recent data about the prevalence of virulence genes and pathotypes among *E. coli* isolates recovered from cases of PWD in Europe are scarce. RESULTS: This study investigates the prevalence of fimbrial and toxin genes of *E. coli* by PCR among 280 farms with PWD across Europe. A total of 873 samples collected within the first 48 h after the onset of PWD (occurring 7-21 days post weaning).

Le colonie con morfologia riconducibile a *Staphylococcus* spp. sono state sottoposte preliminarmente a colorazione di Gram, test dell'ossidasi e della catalasi, e successivamente alla metodica di identificazione biochimica miniaturizzata Api® Staph (bioMérieux) per la conferma. Le colonie che presentavano un profilo corrispondente a *S. aureus* sono state in seguito inviate alla sede di Brescia dell'IZSLER per l'esecuzione delle seguenti analisi di biologia molecolare: (i) identificazione di ceppi meticillino-resistenti (MRSA) mediante PCR multiplex, tramite verifica della presenza dei geni *mecA* e *mecC* e conferma della specie; (ii) ricerca di geni codificanti enterotossine (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *ser*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sep*) con PCR Multiplex; (iii) genotipizzazione mediante Spa typing; (iv) genotipizzazione mediante Multilocus Sequence Typing (MLST).

Determinazione dei profili di antibiotico-resistenza

Gli isolati di *S. suis* e *E. coli* sono stati testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici mediante il metodo Kirby-Bauer (metodo della diffusione su piastra) (CLSI_VET, 2018a, 2018b, 2019), utilizzando due differenti pannelli di molecole antimicrobiche. Il primo, per *S. suis*, conteneva: acido nalidixico (NA), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), cefalotina (KF), ceftiofur (EFT), enrofloxacin (ENR), eritromicina (E), florfenicolo (FFC), kanamicina (K), oxacillina (OX), penicillina (P), pirlimicina (PIR), tetraciclina (TE), trimetoprim + sulfonamidi (SXT). Il secondo, per *E. coli*, era composto da: acido nalidixico (NA), aminosidina (AM), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), apramicina (APR), cefazolina (CZ), enrofloxacin (ENR), florfenicolo (FFC), gentamicina (CN), kanamicina (K), tetraciclina (TE), tilmicosina (TIL), trimetoprim + sulfonamidi (SXT). La lettura è stata effettuata mediante misurazione manuale degli aloni di inibizione e l'interpretazione è stata realizzata secondo standard internazionalmente riconosciuti (CLSI_VET, 2018a, 2018b, 2019), esprimendo un risultato qualitativo (S-sensibile, I-intermedio, R-resistente) per ogni molecola antibiotica testata. In accordo con Luppi et al. (2016), nell'elaborazione dei risultati i ceppi intermedi (I) sono stati considerati come resistenti (R). Le molecole testate sono state raggruppate in accordo con Magiorakos et al. (2012) extensively drug-resistant (XDR) e i ceppi sono stati classificati come: "multi-resistenti" (MDR), se resistenti a più di 3 diverse classi di antibiotici; "con resistenza estesa" (XDR), se resistenti a tutti gli antibiotici ad eccezione di 1 o 2 classi; "pan-resistenti" (PDR), se resistenti a tutte le molecole testate.

RISULTATI

Nel corso dello studio l'allevamento delle scrofe gran parentali (sito 1) e l'ingrasso (sito 3) sono stati visitati due volte ciascuno. Il sito 2, su cui si è focalizzata l'attività di monitoraggio, è stato visitato 55 volte nell'arco dei 5 mesi di attività. Sono state sottoposte a necropsia 89 carcasse: 87 animali provenienti dal sito 2 e 2 suinetti del sito 1 morti dopo aver manifestato sintomatologia neurologica, durante le procedure di carico per il trasporto verso il sito 2.

A seguito della diagnostica batteriologica standardizzata sulle matrici raccolte, sono stati isolati 40 ceppi di *S. suis*, 46 ceppi di *E. coli* e 28 ceppi di *S. aureus*.

*Diagnostica batteriologica e determinazione dei profili di antibiotico-resistenza
Streptococcus suis*

I 40 ceppi di *S. suis* sono stati prevalentemente isolati da valvole cardiache (n=10), polmone (bronchi e pleura) (n=10), liquido cefalo-rachidiano (n=8), amigdale (n=8) e in misura minore dalla milza (n=4). Alla caratterizzazione sierologica, 17 ceppi sono risultati non tipizzabili mentre la restante quota si è quasi equamente distribuita tra i sierotipi rilevabili con le metodiche utilizzate, ad eccezione del sierotipo 2 che è stato isolato una sola volta (Tabella 2).

Tabella 2. Sierotipi di *S. suis* rilevati, in ordine di frequenza.

Table 2. Frequency of *S. suis* serotypes detected.

Sierotipo	n. ceppi	Percentuale
non tipizzabile (NT)	17	42,5%
7	5	12,5%
9	5	12,5%
1	4	10,0%
4	4	10,0%
5	4	10,0%
2	1	2,5%
totale	40	

Dagli antibiogrammi è emersa una diffusa sensibilità alle penicilline (AMC, AMP, P), alle cefalosporine di I (KF) e III (EFT) generazione e agli amfenicoli (FFC) (Figura 1). Nonostante ciò, 33 ceppi (82,5%) sono risultati essere MDR, 2 XDR ed 1 PDR.

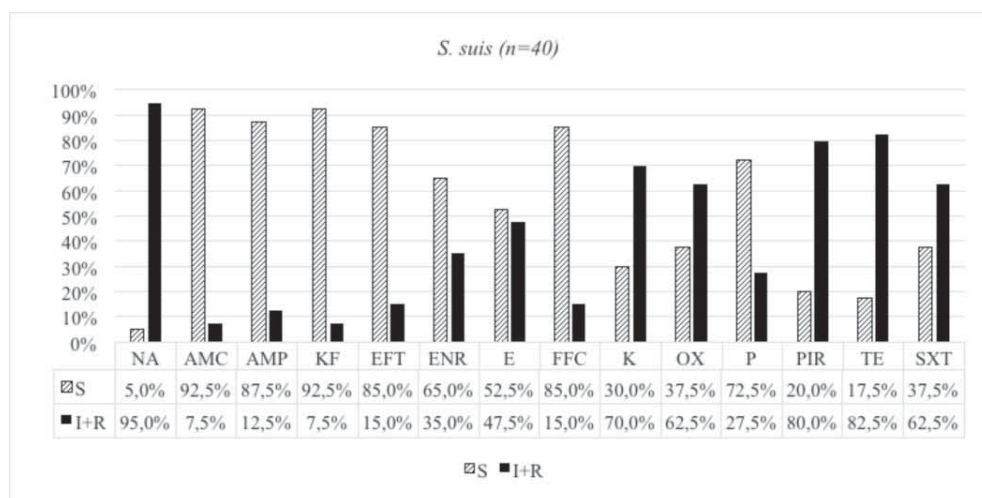


Figura 1. Esiti degli antibiogrammi di *S. suis* nei confronti di: acido nalidixico (NA), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), cefalotina (KF), ceftiofur (EFT), enrofloxacin (ENR), eritromicina (E), florfenicol (FFC), kanamicina (K), oxacillina (OX), penicillina (P), pirlimicina (PIR), tetraciclina (TE), trimetoprim + sulfonamidi (SXT).

Figure 1. Outcomes of *S. suis* antibiograms towards the 14 molecules listed above.

Escherichia coli

I 46 ceppi di *E. coli* sono stati prevalentemente isolati dall'intestino tenue (n=28), ma sono stati rinvenuti anche nei linfonodi mesenterici (n=6), liquido cefalo-rachidiano (n=4), milza (n=3), colon (n=2), valvole cardiache (n=2) e bronchi (n=1). Alla valutazione delle colonie su Agar sangue, 24 ceppi presentavano emolisi. Dalle indagini sierologiche si è osservato come il sierogruppo O20 sia stato il più rappresentato (n=18) (Tabella 3), mentre dalle analisi biomolecolari è emerso che di 6 ceppi, tutti emolitici, 5 erano classificabili come ETEC ed 1 come STEC (Tabella 4).

Tabella 3. Risultati delle analisi sierologiche sui ceppi di *E. coli*, in ordine di frequenza.

Table 3. Frequency of *E. coli* serogroups isolated in the present study.

sierogruppo	n. ceppi	percentuale
O20	18	39,1%
O8	6	13,0%
NT	6	13,0%
O141	5	10,9%
O15	4	8,7%
O86	2	4,3%
O157	2	4,3%
O2	1	2,2%
O128	1	2,2%
O153	1	2,2%
totale	46	

Tabella 4. Genotipizzazione dei ceppi di *E. coli*. Ogni lettera (a-f) rappresenta una diversa combinazione di fattori di patogenicità, mentre il numero a cui le lettere sono associate corrisponde alla frequenza con cui la combinazione si è presentata.

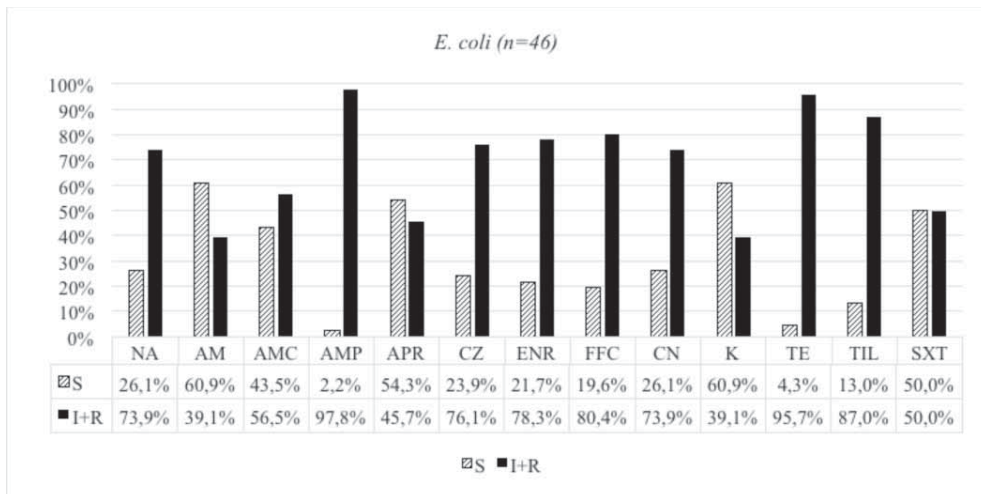
Table 4. *E. coli* strains genotyping. Each letter (a-f) represents a different combination of virulence factors, while the number with which the letters are associated corresponds to the frequency with which the combination occurred.

		Fattori di patogenicità					nessuno	tot ceppi
		F18	LT	STA	STB	STX2E		
n. fattori compresenti	0	-	-	-	-	-	33	33
	1	-	-	-	3 ^a	-	-	3
	2	2 ^b , 1 ^c	3 ^d	2 ^b , 1 ^c	1 ^c , 3 ^d	1 ^c	-	7
	3	3 ^f	-	3 ^f	3 ^f	-	-	3
freq. fattori		6	3	6	10	1		46

Dagli antibiogrammi è emerso che la percentuale di ceppi di *E. coli* sensibili alle 13 molecole non ha mai superato quota 61% (Figura 2), e che la totalità dei ceppi è risultata essere o MDR (n=26) o XDR (n=20).

Figura 2. Esiti degli antibiogrammi di *E. coli* nei confronti di: acido nalidixico (NA), aminosidina (AM), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), apramicina (APR), cefazolina (CZ), enrofloxacin (ENR), florfenicolo (FFC), gentamicina (CN), kanamicina (K), tetraciclina (TE), tilmicosina (TIL), trimetoprim + sulfonamidi (SXT).

Figure 2. Outcomes of *E. coli* antibiograms towards the 13 molecules listed above.



Staphylococcus aureus

Le amigdale, da cui sono stati rilevati 17 dei 28 ceppi totali, si confermano il sito di elezione per l'isolamento di *S. aureus*. Dalle indagini di biologia molecolare è emerso che la quasi totalità dei ceppi (26/28) presentava il gene *mecA* codificante per la resistenza alla meticillina, mentre nessuno presentava il suo omologo *mecC*. Le metodiche di genotipizzazione MLST e SPA typing hanno identificato, rispettivamente, 4 Sequence Types (ST) e 6 Spa types (t), consentendo di raggruppare i ceppi in 7 differenti profili, il più frequente dei quali è stato ST398/t034 (Tabella 5). Infine, la PCR Multiplex per la ricerca dei geni codificanti le enterotossine stafilococciche è risultata positiva per uno solo dei ceppi testati, e ai soli geni *seg* e *sei*. Tale ceppo, oltre a presentare profilo filogenetico proprio, era anche uno dei due privi del gene *mecA*.

Tabella 5. Risultati delle analisi di genotipizzazione effettuate su *S. aureus* mediante Spa typing e MLST.

Table 5. Results of genotyping tests performed on *S. aureus* through Spa typing and MLST.

		MULTILOCUS SEQUENCE TYPING				
		ST398	ST2423	ST7245	ST7246	tot ceppi
SPA TYPING	t034	16	-	-	-	16
	t1939	1	-	-	-	1
	t899	6	-	-	-	6
	t15045	-	1	-	-	1
	t1255	1	-	-	-	1
	t1730	-	-	2	1	3
	tot ceppi	24	1	2	1	28

DISCUSSIONE

I risultati devono essere valutati con cautela considerando il breve lasso di tempo durante il quale è stato condotto lo studio, e la relativamente limitata numerosità dei ceppi isolati ed esaminati. È quindi difficile esprimere delle considerazioni applicabili all'intera filiera produttiva. Nonostante ciò, dall'analisi critica dei risultati emergono alcuni aspetti interessanti. Per quanto riguarda *Streptococcus suis*, tra i 35 diversi sierotipi noti e riportati in letteratura (Gottschalk and Segura, 2019) il sierotipo 2 è storicamente considerato come quello maggiormente diffuso a livello globale e più frequentemente associato a forme cliniche (Goyette-Desjardins et al., 2014). Tuttavia, negli anni, diversi studi hanno riportato un progressivo aumento delle infezioni sostenute dal sierotipo 9, che in alcuni Paesi è diventato quello maggiormente isolato da casi clinici (Willemse et al., 2019; Zheng et al., 2019), e dal sierotipo 7 (Prüfer et al., 2019). Nel presente studio, dei 23 ceppi di *S. suis* risultati tipizzabili (su un totale di 40 ceppi isolati), solo 1 apparteneva al sierotipo 2, mentre la restante quota si è quasi equamente distribuita tra i restanti sierotipi rilevabili con le metodiche adottate.

Dai risultati degli antibiogrammi, l'estesa sensibilità nei confronti delle penicilline (AMC, AMP e P; ad eccezione dell'OX) e delle cefalosporine (KF e EFT), ha confermato l'efficacia dei β -lattamici nel controllo e trattamento dell'infezione negli allevamenti suinicoli. La sensibilità verso la P, nettamente inferiore (72,5%) a quella verso AMP (87,5%), supporta l'ipotesi di una cross-resistenza incompleta nei confronti di queste due molecole. Va ricordato che l'EFT, essendo una cefalosporina di III generazione, rientra tra gli HPCIA (WHO, 2018) e, di conseguenza, andrebbe utilizzata unicamente come ultima scelta (solo a seguito di diagnosi eziologica, test di sensibilità, e resistenza alle molecole di prima e seconda scelta) nel trattamento della streptococcosi. È stata inoltre rilevata un'alta sensibilità verso gli amfenicoli (FFC) (85%). Questi risultati sono in accordo con numerosi altri studi internazionali e nazionali (Marie et al., 2002; Luppi et al., 2016a; Tonni et al., 2021; Cucco et al., 2021). Tuttavia, l'82,5% dei ceppi è risultato essere MDR, il 5% XDR ed il 2,5% PDR. Nel presente studio, infatti, *S. suis* è risultato molto spesso resistente nei confronti di tetracicline (TE), sulfonamidi (SXT), lincosamidi (PIR) e, anche se meno frequentemente, degli aminoglicosidi (K), confermando quanto già riportato in letteratura (Vela et al., 2005; Wisselink et al., 2006; van Hout et al., 2016; Du et al., 2019) aminoglycosides, enrofloxacin, novobiocin and spectinomycin. More than 87% of the *S. suis* isolates were resistant to tetracyclines, sulphonamides, macrolides and clindamycin. Strains of serotype 9 were significantly more resistant than strains of serotype 2 ($P < 0.05$). Inoltre, è stata rilevata una sensibilità del 65% ai fluorochinoloni (ENR) mentre solo il 5% dei ceppi è risultato sensibile ai chinoloni (NA). Tale riscontro è particolarmente allarmante considerata l'importanza critica di queste molecole in medicina umana.

Relativamente a *Escherichia coli*, il 45% dei ceppi isolati e risultati tipizzabili apparteneva al sierogruppo O20. Alle analisi biomolecolari, invece, è stato rilevato unicamente il fattore fimbriale *F18*, riportato in letteratura come il più frequente assieme all'*F4* (Do et al., 2020; García-Meniño et al., 2021). In accordo con Luppi et al. (2016b) due to *Escherichia coli*, is an important cause of economic losses to the pig industry primarily as a result of mortality and worsened productive performance. In spite of its relevance, recent data about the prevalence of virulence genes and pathotypes among *E. coli* isolates recovered from cases of PWD in Europe are scarce.

RESULTS: This study investigates the prevalence of fimbrial and toxin genes of *E. coli* by PCR among 280 farms with PWD across Europe. A total of 873 samples collected within the first 48 h after the onset of PWD (occurring 7-21 days post weaning), 5 ceppi di *E. coli* sono stati classificati come ETEC, poiché in possesso di almeno un gene codificante per le fimbrie e di uno codificante per le tossine, ed 1 ceppo come STEC, poiché in possesso del gene codificante per la tossina *Stx2e* associato solo ad un fattore fimbriale.

Dagli antibiogrammi, la totalità dei ceppi è risultata essere o MDR (n=26) o XDR (n=20). In particolare, per AMP e TE, molecole appartenenti alle due classi di antibiotici più utilizzate nell'allevamento suinicolo (Lekagul et al., 2019; Bassi et al., 2021), sono stati riscontrati gli esiti peggiori, con rispettivamente il 97,8% e 95,7% dei ceppi testati risultati resistenti. Tali risultati concordano con quanto riportato dalla letteratura internazionale e nazionale (Brand et al., 2017; De Lucia et al., 2019; Do et al., 2020; Hayer et al., 2020; Renzhammer et al., 2020; Bosco et al., 2021; De Lorenzi et al., 2021) serotypes, virulence factors and genetic diversity. Serotypes were assigned by agglutination tests and virulence genes were identified by polymerase chain reaction (PCR). Anche per chinoloni (NA) e fluorochinoloni (ENR), entrambi HPCIA, è stata rilevata un'alta percentuale di resistenze, rispettivamente del 73,9% e 78,3%, con valori intermedi rispetto a quanto riportato da altri autori (Bosco et al., 2021; García-Meniño et al., 2021). Un'alta percentuale di resistenze è stata registrata anche verso un altro HPCIA, la tilosina (TIL), col preoccupante valore dell'87%. Il florfenicolo (FFC), nonostante sia considerato un nuovo agente antimicrobico per la medicina veterinaria, viene spesso riportato tra le molecole con alti livelli di resistenza, per via di meccanismi di selezione associati all'azione di elementi genetici mobili come plasmidi, trasposoni e integroni (Chapman, 2003; Blickwede and Schwarz, 2004; Rosengren et al., 2007) quaternary ammonium compounds (QAC). In accordo con questi dati, nel presente studio l'80,4% dei ceppi è risultato essere resistente verso questa molecola. Va infine sottolineata un'alta percentuale di ceppi resistenti anche nei confronti delle cefalosporine di I generazione (CZ), 76,1%, e della gentamicina (CN), 73,4%. Le restanti molecole hanno mostrato esiti migliori, ma con sensibilità mai superiori al 61% dei ceppi.

Per quanto riguarda *Staphylococcus aureus*, il 92,9% dei ceppi isolati è risultato in possesso del gene *mecA* codificante per la resistenza alla meticillina, con una prevalenza del 29,2% nei suinetti testati, in accordo con quanto già riportato in letteratura (Moreno-Flores et al., 2020). In uno studio condotto in allevamenti da ingrasso, alcuni autori (Parisi et al., 2019) hanno riportato una prevalenza del 53,5% nei suini nati e allevati in Italia, e del 90,5% negli animali importati. Inoltre, nel report EFSA (2009) emerge come in Italia il 34,9% degli allevamenti da riproduzione e il 33,9% degli ingrassi risultò positivo per MRSA. Nonostante nei suini la colonizzazione da MRSA sia frequente, raramente questi batteri sono causa di malattia (Simon et al., 2020) respectively. A total of 25 MRSA isolates were isolated from 400 samples, in 17 different fattening units. At farm, 12 out of 250 samples were positive for MRSA (4,8 %). Tuttavia, la diffusione di MRSA rappresenta un grave rischio per la salute pubblica globale (EUCAST, 2017).

Grazie alle metodiche di genotipizzazione è stato possibile raggruppare i 28 ceppi isolati in 7 differenti profili, il più frequente dei quali è risultato essere ST398/t034 (57,1%). In accordo con i dati della bibliografia nazionale (Battisti et al., 2010; Parisi et al., 2019), l'85,7% dei ceppi apparteneva al Sequence Type 398 al test MLST. Alla genotipizzazione mediante Spa typing, il t034 è risultato il più diffuso (57,1%), seguito da t899 (21,4%), Spa type che si collocano rispettivamente al terzo e quinto posto per frequenza nel report EFSA (2009). Va sottolineata, infine, la presenza di 2 ceppi con profilo ST7245/t1730, 1 ceppo con profilo ST7246/t1730 e 1 ceppo con caratteristiche molto diverse dagli altri: negativo per gene *mecA*, positivo per enterotossine stafilococciche *seg* e *sei*, con profilo genotipico ST2423/t15045. Tale risultato meriterebbe ulteriori approfondimenti filogenetici.

CONCLUSIONI

I risultati dello studio confermano l'ampia diffusione dell'AMR negli allevamenti suinicoli. Tale riscontro, considerata la rilevanza del fenomeno anche per la salute pubblica, evidenzia la necessità un approccio olistico che preveda di utilizzare protocolli diagnostici compatibili

con le necessità di campo, di adottare linee guida sull'uso razionale e consapevole del farmaco, e di promuovere la prevenzione delle malattie attraverso, ad esempio, la produzione di vaccini stabulogeni, l'implementazione della biosicurezza e il rispetto dei parametri di benessere.

In questo contesto, diventa di fondamentale importanza la promozione di filiere zootecniche *antibiotic free* anche grazie a studi, come quello appena presentato, che indaghino le principali criticità riscontrate nel loro percorso di creazione. A tal proposito, occorre sottolineare due aspetti gestionali, emersi anche nel corso del presente studio, che ricoprono un ruolo chiave per il conseguimento di tale obiettivo: (i) la necessità di implementare un valido sistema di tracciabilità e identificazione degli animali, che consenta la divisione degli animali in due gruppi distinti (trattati e non), in considerazione della comune difficoltà ad annullare l'uso degli antibiotici su tutti i suini allevati; (ii) la necessità di una efficace e capillare azione di formazione, sensibilizzazione e coinvolgimento sia degli allevatori, che lavorano quotidianamente a contatto con gli animali, sia dell'opinione pubblica. Senza il sostegno di entrambi, ogni obiettivo prefissato diventa irraggiungibile.

BIBLIOGRAFIA

1. Bassi, P., Trevisi, P., Salvarani, C., Pangallo, G., Scali, F., Luppi, A., Rugna, G., Motta, V., Diegoli, G., Merialdi, G., 2021. Ridurre il consumo di antibiotico: risultati di un progetto PSR in 30 aziende dell'Emilia-Romagna nel triennio 2016-2018. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 243–249.
2. Battisti, A., Franco, A., Merialdi, G., Hasman, H., Iurescia, M., Lorenzetti, R., Feltrin, F., Zini, M., Aarestrup, F.M., 2010. Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Vet Microbiol* 142, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.008>
3. Blickwede, M., Schwarz, S., 2004. Molecular analysis of florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. *J Antimicrob Chemother* 53, 58–64. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh007>
4. Bosco, C., Bonilauri, P., Rugna, G., Luppi, A., Fontana, M.C., Fiorentini, L., Bassi, P., 2021. *Escherichia coli* isolati da matrici patologiche di suino in Emilia-Romagna tra il 2017 e il 2021: valutazione delle resistenze agli antibiotici e dei fattori di virulenza. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 121–131.
5. Brand, P., Gobeli, S., Perreten, V., 2017. Pathotyping and antibiotic resistance of porcine enterovirulent *Escherichia coli* strains from Switzerland (2014-2015). *Schweiz Arch Tierheilkd* 159, 373–380. <https://doi.org/10.17236/sat00120>
6. Chapman, J.S., 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation, Hygiene and Disinfection* 51, 271–276. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00044-1)
7. CLSI_VET, 2019. M 100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. CLSI_VET, 2018a. VET01S - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
9. CLSI_VET, 2018b. VET08 - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
10. Cucco, L., Paniccà, M., Massacci, F.R., Morelli, A., Ancora, M., Mangone, I., Di Pasquale, A., Luppi, A., Vio, D., Rolla, U., Cammà, C., Magistrali, C.F., 2021. La caratterizzazione di *Streptococcus suis* isolati da focolai di malattia negli allevamenti italiani

- rivela la diffusione di nuovi cloni con potenzialità zoonosica e resistenti agli antibiotivi. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 85–93.
11. De Lorenzi, G., Alborali, G.L., Baldo, V., Tonni, M., Giovannini, C., Scaburri, A., Ceriali, M.P., Bellini, S., 2021. Pattern di resistenza agli antimicrobici di ceppi di *E. coli* enterotossigeni (ETEC) e ceppi di *E. coli* commensali isolati in suinetti con diarrea neonatale. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 329–334.
 12. De Lucia, A., Ostanello, F., Smith, R.P., Davies, R., Card, C., Rambaldi, M., Martelli, P., 2019. Resistenza agli antibiotici in *Escherichia coli* isolati in un allevamento di suini dopo la sospensione dell'utilizzo degli antibiotici. Presented at the XLV Meeting annuale SIPAS, pp. 101–108.
 13. Diegoli, G., Granito, G., Luppi, A., Masera, F., Merialdi, G., Miraglia, V., Mussini, P., Trevisi, P., Trambajolo, G., 2018. LINEE GUIDA Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino 34.
 14. Do, K.-H., Byun, J.-W., Lee, W.-K., 2020. Virulence genes and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic weaned piglets in Korea. *J Anim Sci Technol* 62, 543–552. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.4.543>
 15. Du, F., Lv, X., Duan, D., Wang, L., Huang, J., 2019. Characterization of a Linezolid- and Vancomycin-Resistant *Streptococcus suis* Isolate That Harbors *optrA* and *vanG* Operons. *Frontiers in Microbiology* 10.
 16. ECDC, EFSA, EMA, 2017. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals *EFSA Journal* 2017;15(10):5017. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5017>
 17. ECDC, EFSA, EMA, 2015. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals *EFSA Journal* 2015;13(1):4006, 114 pp. <https://doi.org/doi:10.2903/j.efsa.2015.4006>
 18. EFSA, 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 - Part A: MRSA prevalence estimates. *EFSA Journal* 7, 1376. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1376>
 19. EMA, 2020. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. Trends from 2010 to 2018. Tenth ESVAC report.
 20. EMA, EFSA, 2017. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion, RONAFSA *EFSA Journal* 2017;15(1):4666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4666>
 21. EUCAST, 2017. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2.0. ed. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
 22. García-Meniño, I., García, V., Alonso, M.P., Blanco, J.E., Blanco, J., Mora, A., 2021. Clones of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* implicated in swine enteric colibacillosis in Spain and rates of antibiotic resistance. *Veterinary Microbiology* 252, 108924. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108924>
 23. Gottschalk, M., Segura, M., 2019. Streptococcosis, in: *Diseases of Swine*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 934–950. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch61>
 24. Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M., 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* 3, e45. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.45>
 25. Hayer, S.S., Rovira, A., Olsen, K., Johnson, T.J., Vannucci, F., Rendahl, A., Perez, A., Alvarez, J., 2020. Prevalence and time trend analysis of antimicrobial resistance in re-

- spiratory bacterial pathogens collected from diseased pigs in USA between 2006-2016. *Res Vet Sci* 128, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.11.010>
26. Jim O’Neill, 2014. AMR Review Paper - Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance.
 27. Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., Yeung, S., 2019. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Vet Anim Sci* 7, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>
 28. Luppi, A., Bonilauri, P., Maioli, G., Gherpelli, Y., Dottori, M., 2016a. Resistenza agli antibiotici in ceppi di *Streptococcus suis* isolati nel suino nel periodo 2004-2014. Presented at the XLII Meeting Annuale SIPAS, pp. 133–137.
 29. Luppi, A., Gibellini, M., Gin, T., Vangroenweghe, F., Vandenbroucke, V., Bauerfeind, R., Bonilauri, P., Labarque, G., Hidalgo, A., 2016b. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag* 2, 20. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0039-9>
 30. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
 31. Marie, J., Morvan, H., Berthelot-Hérault, F., Sanders, P., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A.V., Jouy, E., Kobisch, M., 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *J Antimicrob Chemother* 50, 201–209. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf099>
 32. Ministero della Salute, 2017. Piano Nazionale di Contrasto dell’Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020. Ministero della Salute Italiano.
 33. Ministero della Salute, CRAN-AR, 2022. Piano di monitoraggio armonizzato sulla resistenza agli antimicrobici di batteri zoonotici e commensali ai sensi della Decisione di esecuzione (UE) 2020/1729 della Commissione del 17 novembre 2020 - Anno 2022. Ministero della Salute Italiano, in collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale per l’Antibiotico-resistenza (CRAN-AR), c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana.
 34. Moreno-Flores, A., Potel-Alvarellos, C., Francisco-Tomé, M., Constenla-Caramés, L., Pérez-Roth, E., López-Cotón, C., Comesaña-Da Vila, E., Eiroa-de la Puente, L., Álvarez-Fernández, M., 2020. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in swine housed indoors in Galicia, Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 38, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.03.009>
 35. 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. *Food Microbiol* 82, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.003>
 36. Prüfer, T.L., Rohde, J., Verspohl, J., Rohde, M., Greeff, A. de, Willenborg, J., Valentin-Weigand, P., 2019. Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996-2016. *PLOS ONE* 14, e0210801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210801>
 37. Renzhammer, R., Loncaric, I., Roch, F.-F., Piniör, B., Käsbohrer, A., Spersger, J., Ladinig, A., Unterweger, C., 2020. Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistances in *E. coli* Associated with Neonatal Diarrhea, Postweaning Diarrhea, and Edema Disease in Pigs from Austria. *Antibiotics* 9, 208. <https://doi.org/10.3390/antibiot-ics9040208>

38. Rosengren, L.B., Waldner, C.L., Reid-Smith, R.J., Dowling, P.M., Harding, J.C.S., 2007. Associations between feed and water antimicrobial use in farrow-to-finish swine herds and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from grow-finish pigs. *Microb Drug Resist* 13, 261–269. <https://doi.org/10.1089/mdr.2007.781>
39. Simon, A.C., Baldo, V., Losio, N., Filipello, V., Colagiorgi, A., Scali, F., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., Alborali, G.L., 2020. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the pig production chain in Northern Italy. *Italian Journal of Food Safety* 9. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8412>
40. Tonni, M., Formentini, N., Guarneri, F., Romeo, C., Guadagno, F., Scali, F., Rota Nodari, S., Bano, L., Bacchin, C., Maisano, A.M., Vezzoli, F., Rosignoli, C., Santucci, G., Luppi, A., Zoppi, S., Pasquali, P., Alborali, G.L., 2021. Caratterizzazione molecolare e profili di antimicrobico-resistenza di ceppi di *Streptococcus suis* isolati in allevamenti del nord Italia nel periodo 2013 – 2020. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 133–143.
41. Torreggiani, T., Torri, D., Maioli, G., Prosperi, A., Chiapponi, C., Bonilauti, P., Gherpelli, Y., Manfredi, R., Dottori, M., Luppi, A., 2021. *Escherichia coli* enterotossigeni isolati da focolai di colibacilloso enterica post-svezzamento. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 201–206.
42. van Hout, J., Heuvelink, A., Gonggrijp, M., 2016. Monitoring of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* in the Netherlands, 2013–2015. *Vet Microbiol* 194, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.03.014>
43. Vela, A.I., Moreno, M.A., Cebolla, J.A., González, S., Latre, M.V., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2005. Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Vet Microbiol* 105, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.10.009>
44. WHO, 2018. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 6th Revision. World Health Organization - Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance.
45. Willemse, N., van der Ark, K.C.H., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H., Picavet, D.I., van Solt-Smits, C., Wisselink, H.J., Schultsz, C., de Greeff, A., 2019. Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. *Sci Rep* 9, 15429. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0>
46. Wisselink, H.J., Veldman, K.T., Van den Eede, C., Salmon, S.A., Mevius, D.J., 2006. Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 113, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.035>
47. Zheng, H., Du, P., Qiu, X., Kerdsin, A., Roy, D., Bai, X., Xu, J., Vela, A.I., Gottschalk, M., 2019. Correction to: Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. *Veterinary Research* 50, 62. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0680-9>