

SENSIBILITA' AGLI ANTIMICROBICI IN CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATI DA SUINO

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM SWINE

VIO D.*, USTULIN M.*, DI GIUSTO T.**, DEOTTO S.**, DRIGO, I.***,
TONON F.****, GIORGIUTTI M.*****, CONEDERA G.*, COCCHI M.*

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone

** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Udine

*** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Treviso

**** Medico Veterinario libero-professionista, San Vendemmiiano (TV)

***** Medico Veterinario libero-professionista, Pagnacco (UD)

Parole chiave: *Staphylococcus aureus*, antibiotico sensibilità, suino

Key words: antimicrobial susceptibility, *Staphylococcus aureus*, swine

Riassunto. *Staphylococcus (S.) aureus* è un batterio Gram positivo, frequentemente associato a patologie sia nell'uomo che negli animali. In seguito all'introduzione della penicillina si è assistito rapidamente alla diffusione di ceppi resistenti; analogamente per la meticillina i ceppi resistenti sono comparsi poco tempo dopo l'inizio del suo utilizzo in ambito terapeutico. La segnalazione di ceppi *S. aureus* meticillino resistenti negli animali ha posto un grave problema in sanità pubblica per la possibilità di trasmissione all'uomo. Detti ceppi presentano resistenza a più classi di antimicrobici contemporaneamente. Diversi studi condotti hanno mostrato una differenza geograficamente variabile di prevalenza. Scopo del presente studio è stato valutare il *pattern* di antibiotico resistenza in ceppi di *S. aureus* isolati dal suino. 44 ceppi sono stati sottoposti a test di sensibilità agli antimicrobici seguendo le linee del CLSI. I risultati mostrano una elevata percentuale di resistenza a penicillina, ampicillina e tetraciclina (93%), mentre una resistenza pari al 20% dei ceppi esaminati nei confronti del sulfamidico potenziato. Il 23% dei ceppi testati presentavano resistenza alla meticillina e ad altre molecole, quali penicillina, ampicillina e tetraciclina.

Abstract. *Staphylococcus (S.) aureus* is a Gram positive bacterium. It is frequently involved in opportunistic infections both in humans and in animals. It can cause heavy economic losses in animal farms due to pathology and to treatment costs. The emergence of "livestock associated" methicillin-resistant *S. aureus* has raised the role of this bacterium in pigs. Moreover the resistance to commonly used antimicrobials is normally associated to *S. aureus* strains. In human beings resistant strains have been reported shortly after the introduction of penicillin in therapeutic field. Similarly after the introduction of methicillin, resistance was detected. These strains are widely distributed and are characterized by multidrug resistance. Emerging resistance to different molecules, particularly among methicillin resistant *S. aureus* represents a risk to public health. As the prevalence of resistance is geographically variable, local investigations should be performed. The objective of this study is to characterize the antimicrobial susceptibility

of 44 *S. aureus* strains isolated from swine trough 2011. Methicillin-resistance and MIC to vancomycin were evaluated, too. Resistance was most common to penicillin, ampicillin and tetracycline (93%). Resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim was 20%, and there was no resistance to cephalotin. In 3 farmers methicillin-resistant strains were identified, with a total of 10 strains. These strains appeared to be multidrug resistant.

INTRODUZIONE

Staphylococcus (S.) aureus è un microrganismo Gram positivo, responsabile di numerose patologie negli animali. Nel suino *S. aureus* è responsabile di mastite, vaginite, metrite e formazione di ascessi in seguito a fenomeni batteriemici (B. E. Straw, 2006). In generale, i batteri Gram positivi sono considerati patogeni importanti non solo in ambito veterinario ma anche in medicina umana, dove causano gravi infezioni nosocomiali (Rice L.B., 2006). Per quanto riguarda *S. aureus* esso è responsabile di infezioni a carico dei tessuti molli e duri che possono evolvere in gravi batteriemie. Esso svolge la sua azione patogena sia tramite l'elaborazione di tossine, che causano lisi delle cellule della serie rossa (emolisine), della serie bianca (leucocidina), o che possono svolgere azione fibrinolitica (stafilocinasi), sia tramite la produzione di enzimi che conferiscono al microrganismo la capacità di resistere all'azione di una o più classi di antimicrobici. Lo sviluppo dell'antibiotico resistenza in ceppi di *S. aureus* è ampiamente documentata: la resistenza alla penicillina è stata segnalata pochi anni dopo la sua introduzione per scopi terapeutici e, analogamente, la successiva introduzione della meticillina ha determinato la comparsa di ceppi meticillino-resistenti (MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). Essi rivestono importanza in sanità pubblica, sia per la presenza della resistenza a più classi di antibiotici, sia per la recente ipotesi di diffusione di cloni nell'animale e nell'uomo (Lewis *et al.*, 2008). I primi ceppi MRSA sono stati isolati in ambito ospedaliero (HA-MRSA, hospital acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), mentre recentemente sono stati segnalati ceppi definiti community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), geneticamente non correlati ai ceppi HA-MRSA, e identificati in casi caratterizzati da fattori di rischio differenti da quelli definiti per i ceppi HA-MRSA (Foster, 2004). La meticillino resistenza è codificata a livello cromosomiale e determina la formazione di una proteina con una bassa affinità per gli antibiotici beta – lattamici. In ambito umano, inoltre, l'attenzione nei confronti dei ceppi di MRSA è stata ampliata allo studio della resistenza alla vancomicina (molecola usata nella terapia delle infezioni da MRSA) per la comparsa di ceppi VRSA, vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. Questa resistenza è causata dal trasferimento orizzontale di un transposone contenente il gene *vanA* e geni associati, da ceppi di *Enterococcus* vancomicina resistenti. In ambito veterinario, ceppi MRSA sono stati descritti nel suino e nel bovino (Foster, 2004). Dal momento che la terapia antibiotica costituisce un punto essenziale nel trattamento e nel controllo di queste infezioni, e considerando il possibile trasferimento di fattori di resistenza dall'animale all'uomo, il monitoraggio della comparsa e della diffusione di ceppi resistenti costituisce punto importante per le implicazioni sia terapeutiche sia di sanità pubblica. Scopo del presente studio è stato fornire informazioni sulla prevalenza dell'antibiotico resistenza in ceppi di *S. aureus* isolati da tampone nasale di suino, determinando la sensibilità a cinque molecole antibiotiche e valutando inoltre la presenza della meticillino resistenza e della sensibilità alla vancomicina.

MATERIALI E METODI

Analisi batteriologica. Nel periodo ottobre-dicembre 2011, sono stati collezionati 160 tamponi nasali da 8 scrofaie considerate rappresentative per tipologia di allevamento e numero di animali allevati degli allevamenti da riproduzione delle regioni Friuli Venezia Giulia e Veneto. In ogni azienda sono stati eseguiti 20 tamponi da singole scrofe clinicamente sane.

In laboratorio, i tamponi sono stati inoculati su Heart Infusion Broth (fornito dal Centro Servizi alla Produzione, IZSVe) per 24 ore a 37 ± 1 °C. Successivamente, dalla brodocoltura un'ansata di materiale è stata seminata su agar sangue (fornito dal Centro Servizi alla Produzione, IZSVe) e su mannitol-salt-agar (Oxoid). I terreni sono stati incubati a temperatura di 37 ± 1 °C per 24-48 ore. Al termine del periodo di incubazione dalle colonie sospette *Staphylococcus* spp sono state eseguite prove biochimiche di identificazione: colorazione di Gram, test della catalasi, test della coagulasi (plasma di coniglio), test di sensibilità alla polimixina B (300 mg, Oxoid).

L'identificazione biochimica è stata confermata utilizzando un sistema biochimico miniaturizzato (API STAPH - Biomerieux).

Test di sensibilità agli antimicrobici. I ceppi batterici identificati come *S. aureus* sono stati sottoposti a test di sensibilità agli antimicrobici usando il metodo dell'agar diffusione, in accordo con le linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). I principi attivi utilizzati sono stati i seguenti: penicillina (P, 10 mg – Becton Dickinson-), ampicillina (AMP, 10 mg – Becton Dickinson -), tetraciclina (TE, 30 mg – Oxoid -), sulfametozazolo+trimetropim (SXT, 1,25 mg – Oxoid -) e cefalotina (CFL, 30 mg – Oxoid -). Gli isolati sono stati classificati in sensibile, intermedio, resistente, in accordo con quanto riportato dal CLSI.

L'analisi della meticillina resistenza è stata condotta utilizzando il test dell'agar diffusione, introducendo un dischetto di oxacillina (OXA, 10 mg – Becton Dickinson -) e uno di cefoxitina (FOX, 30 mg – Oxoid-), secondo quanto descritto dal CLSI. Nel presente studio, inoltre, il tampone è stato inoculato su terreno Oxacillin Resistance Screening Agar Base, ORSAB (Oxoid), incubato a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ per 24 ore.

Analisi molecolare. Tutti i ceppi sono stati sottoposti alla ricerca per il gene *mecA*. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale “GeneElute Bacterial genomic DNA kit” (Sigma-Aldrich). La ricerca gene *mecA* è stata eseguita secondo quanto descritto da Louie et al, 2002 (9).

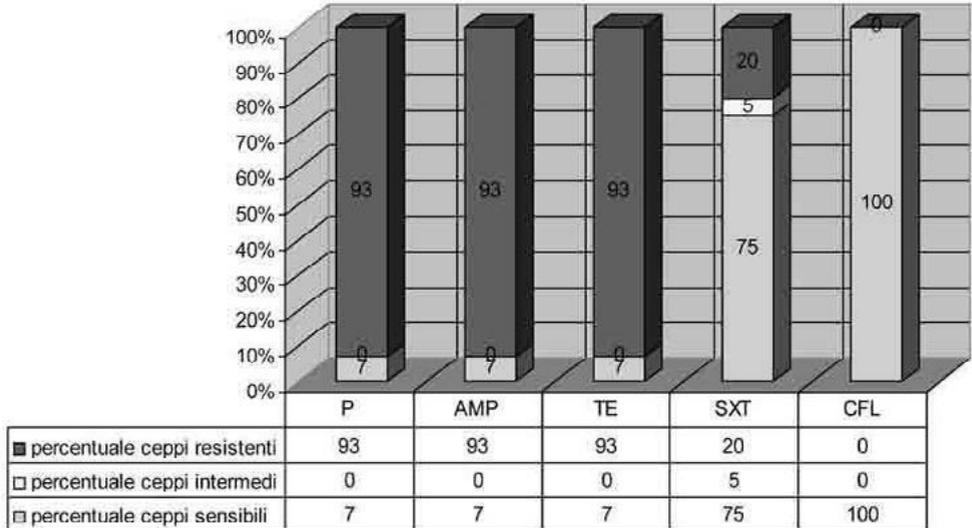
Per quanto riguarda la vancomicina è stata eseguita MIC con micro diluizione.

RISULTATI

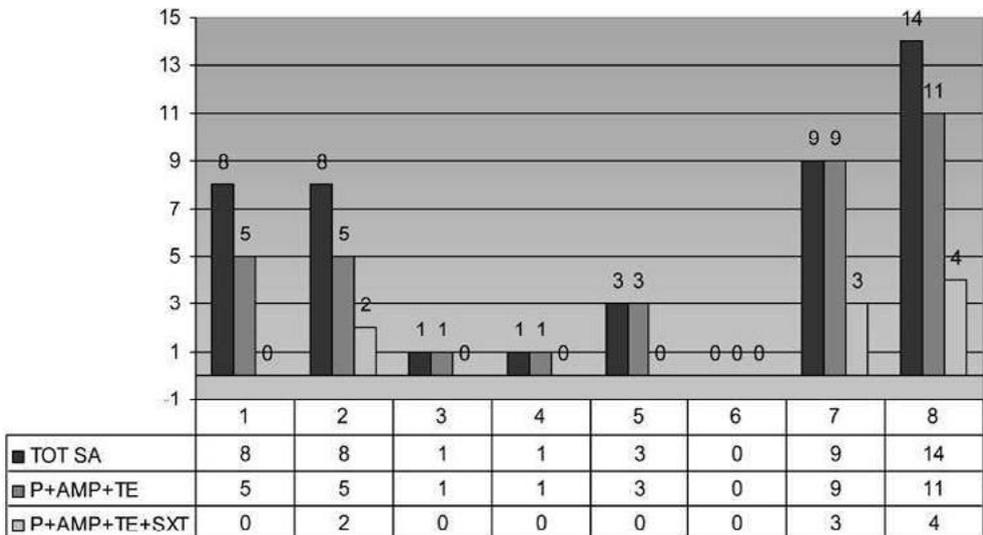
Analisi batteriologica. *S. aureus* è stato identificato in 44 dei 160 tamponi nasali eseguiti (27%), appartenenti a 7 differenti allevamenti.

Test di sensibilità agli antimicrobici. 41/44 (93%) dei ceppi testati presentavano resistenza a P, AMP e TE. 9/44 (20%) erano resistenti a SXT, mentre tutti i ceppi di *S. aureus* risultavano sensibili alla CFL. Tutti i ceppi resistenti a P erano resistenti anche ad AMP e a TE e i nove ceppi resistenti al SXT erano resistenti anche a P, AMP e TE. In totale, 35/44 (79%) ceppi mostravano resistenza a P+AMP+TE, mentre 9/44 (20%) erano resistenti a P+AMP+TE+SXT. In figura 1 e 2 sono riportate le percentuali dell'antibiotico resistenza riferita alla singola molecola e a più molecole, rispettivamente.

**Figura 1. SENSIBILITÀ (ESPRESSA IN PERCENTUALE) DEI CEPPI ALLE MOLECOLE TESTATE.
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST TO THE DIFFERENT DRUG'S CLASSES**

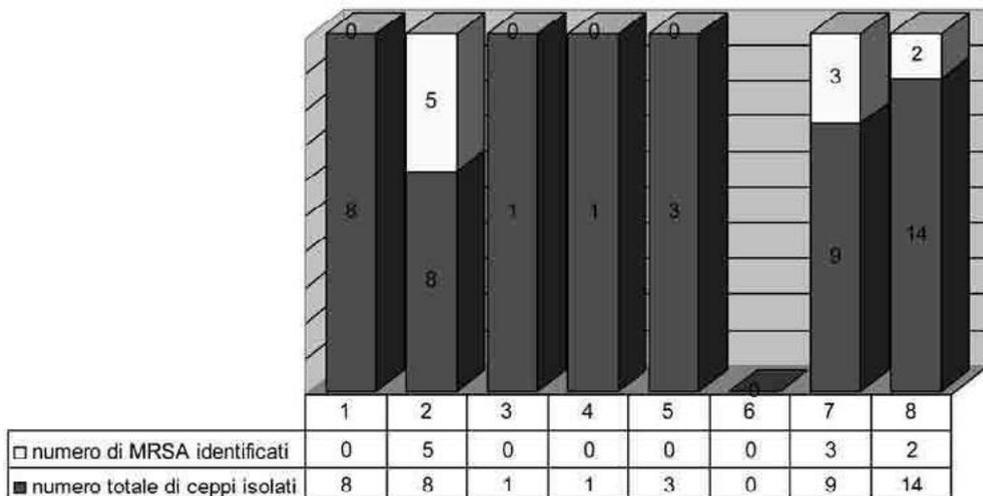


**Figura 2. RESISTENZA A PIÙ CLASSI DI ANTIMICROBICI TESTATI, SUDDIVISI PER ALLEVAMENTO.
MULTIDRUG RESISTANT STRAINS**



Meticillino - resistenza. 10/44 (23%) ceppi appartenenti a tre aziende, presentavano resistenza all'OXA e alla FOX. Tutti i ceppi MRSA erano inoltre resistenti a P, AMP, e TE, e di questi 3 (30%) risultavano resistenti anche al SXT. Tutti i ceppi meticillino resistenti presentavano il gene *mecA* ed erano cresciuti su ORSAB. In figura 3 la distribuzione per allevamento dei ceppi MRSA identificati nel presente studio.

Figura 3. NUMERO DI CEPPI MRSA/NUMERO DI CEPPI DI *S. AUREUS* IDENTIFICATI PER ALLEVAMENTO. DISTRIBUTION OF MRSA IN EACH FARM.



Per quanto riguarda la resistenza alla vancomicina, 9/10 ceppi presentavano una MIC pari a 0,5 mg/ml, mentre un ceppo presentava una MIC pari a 1 mg/ml.

DISCUSSIONE

Nel presente studio, i ceppi hanno mostrato una elevata resistenza a penicillina, ampicillina e tetraciclina (93%), in accordo con quanto descritto da altri autori. Secondo Rubin *et al.* (2011), infatti, i ceppi di *S. aureus* isolati da suino presentano una resistenza a tetraciclina e penicillina molto più alta rispetto a quanto riscontrato in ceppi isolati dal cavallo, dal bovino e dall'avicolo. Baba *et al.* (2011), riportano una resistenza alla P pari al 93.8% negli isolati suini, rispetto a valori del 22.0% e del 10.7% negli isolati bovini e avicoli, rispettivamente. I dati, diversamente da quanto presentato in questo lavoro, sono riferiti ad isolati suini di *S. aureus* ottenuti in caso di dermatite e artrite. Nel nostro caso i ceppi derivavano da animali senza segni clinici riferibili a patologie da stafilococco. La resistenza a queste molecole è probabilmente imputabile all'utilizzo delle stesse in allevamento: secondo Van Djiurken *et al.* (2008) gli isolati suini sono ampiamente resistenti alla tetraciclina, per l'ampio utilizzo che ne viene fatto in terapia. La presenza di questa resistenza sarebbe inoltre legata alla presenza di particolari spa-tipi e lineaggi genetici di *S. aureus* diffusi in diversi paesi europei. Inoltre, la resistenza a più classi di antibiotici testati risulta variare dal 20% (P+AMP+TE+SXT) al 79% (P+AMP+TE), dato in accordo con quanto riportato da Baba *et al.* (2011), i quali sottolineano come il 68.8% dei ceppi sottoposti ad indagine risultavano resistenti a due o più classi di

antimicrobici. Per quanto concerne lo studio della meticillina resistenza, l'utilizzo del terreno ORSAB su cui è stato inoculato direttamente il campione ha dato esiti concordi con quanto rinvenuto con il metodo dell'agar diffusione (sia con l'utilizzo della molecola dell'oxacillina che con quella della cefoxitina) e con i risultati della biologia molecolare. L'indagine circa la presenza di ceppi MRSA è collegata all'importanza che i ceppi CA-MRSA hanno assunto nel tempo. L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA, 2009) ha pubblicato nel 2009 la prima indagine a livello comunitario sull'MRSA nei suini da riproduzione, sottolineando come possa essere comunemente rinvenuto in questa tipologia di allevamento. L'EFSA ha pubblicato inoltre un parere sulla rilevanza, in termini di salute pubblica, della presenza di MRSA in alimenti e animali. In questo parere si sottolinea come la contaminazione degli alimenti da MRSA sia ritenuta possibile. È stato sottolineato che gli individui a contatto con animali vivi, caratterizzati da alta prevalenza di MRSA, sono sottoposti ad un rischio maggiore rispetto alla popolazione in generale. L'EFSA afferma che il contatto diretto con animali vivi e con il loro ambiente può essere una delle principali modalità di trasmissione all'uomo. Pertanto il monitoraggio della presenza in allevamento di ceppi MRSA costituisce un importante mezzo di controllo della diffusione degli stessi, considerando anche la differente distribuzione sul territorio europeo dei ceppi MRSA. In ambito buiatico, studi multicentrici hanno evidenziato una differente distribuzione dei ceppi MRSA, con un *range* che varia da un valore di prevalenza pari allo 0% (studio norvegese) a un valore pari al 10% (studio belga) (Bengtsson B. *et al.*, 2009; Vanderhaeghen W. *et al.*, 2010). Analoghe differenze sono riportate anche nell'allevamento suino (Lewis H.C. *et al.*, 2008), sottolineando l'importanza della conoscenza della prevalenza rapportata ai vari territori di allevamento del suino.

Per diversi anni la vancomicina è stato l'unico trattamento efficace nei confronti delle infezioni sostenute da MRSA nell'uomo: a partire da metà degli anni '90, sono stati identificati ceppi di *S. aureus* con un profilo di resistenza intermedio alla vancomicina (VISA, vancomicin-intermediate *S. aureus*). La comparsa di questi ceppi è stata associata epidemiologicamente a soggetti sottoposti a terapia prolungata nel tempo (25 giorni a 18 settimane) (Rice L.B., 2006). In accordo con quanto riportato nel manuale del CLSI, i ceppi VISA sono quelli che presentano una MIC fra 4mg/ml e 8mg/ml, mentre i ceppi VISA eterogenei sembrano essere sensibili alla vancomicina ma contengono subpopolazioni con ridotta sensibilità alla vancomicina: ad oggi questa situazione è associata a valori di MIC compresi fra 1 mg/ml e 2 mg/ml. Dati concernenti la ridotta efficacia clinica dei glicopeptidi sono stati recentemente pubblicati in ceppi con MIC fra 1 mg/ml e 2 mg/ml. Da quanto esposto, appare importante segnalare la comparsa di ceppi MRSA con diminuita sensibilità alla vancomicina, anche in ambito veterinario. A questo fine si deve però considerare la difficoltà laboratoristica, sia con il test della diffusione in agar che con la MIC, nell'evidenziare la presenza di subpopolazioni a comportamento eterogeneo nei confronti della vancomicina (Appelbaum, 2007). Lo studio condotto ha costituito un primo approccio allo studio della sensibilità della vancomicina in ceppi MRSA da suino, che dovrà essere ampliato e valutato anche con altre tecniche.

CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di valutare il pattern di antibiotico resistenza in ceppi di *S. aureus* isolati in suini clinicamente sani provenienti da 8 scrofaie considerate rappresentative per tipologia di allevamento e numero di animali allevati degli allevamenti da riproduzione delle regioni Friuli Venezia Giulia e Veneto. Le molecole scelte hanno permesso di effettuare valutazioni in merito alla resistenza ad alcune classi di chemioterapici. L'utilizzo della penicillina permette di avere informazioni sulla sensibilità del ceppo ad altri beta lattamici, mentre l'oxacillina e la cefoxitina consentono di evidenziare ceppi meticillina resistenti. Nel nostro indagine, il 93% dei ceppi

presentano resistenza contemporaneamente alla penicillina, all'ampicillina e alla tetraciclina. P, e AMP sono ampiamente utilizzate nell'allevamento suino. Tra le sostanze ad azione antibatterica più utilizzate in miscela nei mangimi troviamo anche le tetracicline, utilizzate per la profilassi e il trattamento della rinite atrofica e delle malattie delle vie respiratorie profonde, spiegando in questo modo l'elevato pattern di antibiotico resistenza nei confronti di questa molecola. Inoltre, le differenze registrate in studi multicentrici condotti in diverse realtà produttive europee sottolineano l'importanza della conoscenza della prevalenza al fine di intraprendere adeguate strategie di controllo, alla tipologia di allevamento e alla prevalenza.

La resistenza agli antimicrobici nei batteri Gram positivi è un importante problema sia da un punto di vista terapeutico sia per le implicazioni di sanità pubblica. In particolare in ambito veterinario le segnalazioni di resistenze in diverse specie del genere *Staphylococcus* richiedono attenzione. Le recenti segnalazioni in Europa di isolamenti di *Staphylococcus intermedius* meticillino-resistente (MRSI) "mecA positivo" a partire da tamponi cutanei di cani e gatti evidenzia l'importanza dell'attenzione che deve essere data allo studio dell'antibiotico resistenza negli animali da reddito e da compagnia (Meucci, V. et al., 2010). La trasmissione all'uomo da animali d'affezione, inoltre, è stata dimostrata in Olanda.

Il monitoraggio della resistenza agli antimicrobici dei microrganismi patogeni e dei commensali costituisce un passo importante che influenza sia l'approccio terapeutico che gli interventi da attuare per un uso appropriato degli stessi.

BIBLIOGRAFIA

Appelbaum, P.C. (2007). "Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Ant Agents.* 30: 398-408.

Baba K., Ishihara K., Ozawa M., Usui M., Hiki M., Tamura Y., and Asai T. "Prevalence and mechanism of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from diseased cattle, swine and chicken in Japan". *J Vet Med Science.* Accepted date: 26 nov 2011

Bengtsson B., Unnerstad HE., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Ost M., Waller KP. (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. 136. 142-149.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). M31-A3. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Vol 28. n 8.

EFSA (2009). Valutazione della rilevanza per la salute pubblica di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) negli animali e negli alimenti doi:10.2903/j.efsa.2009.993

B. E. Straw, J. J. Zimmermann, S. D'Allaire, D. J. Taylor (2006). „Diseases of swine”, 9th Edition, Ames (Iowa Usa) Blackwell Publishing.

Foster T.J. (2004). The *Staphylococcus aureus* superbug. *Clin Invest.* Dec;114 (12):1693-1696

Lewis C.H., Molbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau m., Sorum M., and Skov R.L. (2008) Pigs as a source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases.* 14:1383-1389.

Meucci V, Vanni M, Guardabassi L, Moodley A, Soldani G, Intorre L. (2010). Evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. *Vet Res Commun.* 34 Suppl 1:S79-82.

Rice L.B. (2006). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria". *Am J Infect Control.* 34:S11-9.

Rubin J.E., Ball K.R., Chirino-Trejo M. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from various animals. *Can Vet J.* 52: 153-157.

Vanderhaeghen W., et al., Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol* (2010), doi: 10.1016/j.vet-mic.2009.12.044