

STUDIO DELL'EPIDEMIOLOGIA DI *STREPTOCOCCUS SUIS* (MEDIANTE UTILIZZO DI SIEROTIPIZZAZIONE E DETERMINAZIONE DELLA PRESENZA DI FATTORI DI VIRULENZA) E DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA (AMR) IN UNA FILIERA PRODUTTIVA ITALIANA

***STREPTOCOCCUS SUIS* EPIDEMIOLOGY (USING SEROTYPING AND PRESENCE OF VIRULENCE FACTORS) AND AMR (ANTIMICROBIAL RESISTANCE) IN A LARGE PIG PRODUCTION SYSTEM IN ITALY**

SANDRI G. ¹, GIOVANARDI D. ², PESENTE P. ², ROSSI G.²

¹ Agricola Tre Valli/Gruppo Veronesi ;² Laboratorio Tre Valli/Gruppo Veronesi

Parole chiave: *Streptococcus suis*, fattori di virulenza, patotipo, multiplex PCR, antibioticosensibilità
Key words: *Streptococcus suis*, virulence factors, pathotype, multiplex PCR, antimicrobial sensitivity

Riassunto

Streptococcus suis è uno dei patogeni batterici che più frequentemente induce forme cliniche nella fase del post svezzamento. Sebbene ampiamente diffuso e presente al livello mondiale con oltre trenta sierotipi diversi, solo alcuni sierotipi sono responsabili di forme cliniche quali meningite, setticemia e artrite. Per evidenziare se e quali fossero i sierotipi presenti all'interno delle filiere di un sistema di produzione integrato è stato fatto uno studio della durata di quattro anni che ha catalogato e messo in correlazione origine dei casi, quadri clinici, risultati batteriologici, presenza di fattori di virulenza e sensibilità agli antimicrobici. Dall'analisi dei dati raccolti emerge che il tipo capsulare più frequentemente isolato è il 9, seguito dall' 1/2 . La maggior parte degli isolati ha mostrato un profilo Arc/mrp/Sly + o comunque ha confermato la presenza di uno o più fattori di virulenza. Non è invece stato possibile stabilire una correlazione univoca per sierotipo e/o patotipo intra e inter filiera. Il monitoraggio della sensibilità agli antibatterici negli ultimi 13 anni ha evidenziato come gli antibiotici betalattamici abbiano mantenuto nel tempo un ottimo livello di sensibilità confermandoli come molecole di prima scelta per un intervento terapeutico.

Abstract

Streptococcus suis is definitely one of the most frequently isolated bacteria inducing severe clinical pictures in the post weaning stage. Although present worldwide with over 30 different serotypes, only few among these are able to induce clinical pictures like meningitis, septicemia and arthritis. In order to understand if and which were the serotypes possibly circulating in the different flows of a large integrated production system a study was carried over during a four years long correlating the origin of the isolates, the clinical pictures, bacteriology results, presence of virulence factors and antimicrobial sensitivity. Collected data confirm that the most frequently isolate is type 9 followed by type 1/2. Most of the isolates showed a Arc/mrp/Sly + profile or anyhow confirmed the presence of at least one or more virulence factors. On the contrary it was impossible to establish a one way correlation with a certain serotype along a determinate flow or even among different flows. Monitoring antimicrobial sensitivity during the last 13 years highlighted how betalactamic antibiotics maintained a very high sensitivity in time confirming these molecules as first choice for therapy.

INTRODUZIONE

Anche se *Streptococcus suis* può essere responsabile di problemi clinici durante tutta la vita produttiva del suino è il secondo patogeno più frequentemente isolato nei suinetti svezzati dopo ETEC *E. coli*. A livello mondiale sono stati descritti/segnalati fino a trenta differenti tipi capsulari di *Streptococcus suis* ma solo un numero limitato di questi causano problemi clinici significativi. Lo scopo di questo studio è descrivere i risultati di un'indagine epidemiologica condotta nelle filiere di un grande sistema produttivo multisede italiano, durata quattro anni, mostrando la distribuzione verticale dei sierotipi e patotipi. Il termine patotipo si riferisce alla variante di un particolare microrganismo, capace di indurre forme cliniche, differenziabile da altri ceppi della propria specie sulla base dei suoi marker molecolari e virulenza. Nell'ambito dello studio è stata anche analizzata l'evoluzione nel tempo del pattern dell'Antibiotico Sensibilità nei confronti di *Streptococcus suis*.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra il 2010 e il 2014, per la ricerca di *Streptococcus suis*, sono stati esaminati cervello, fegato, milza, polmone e articolazioni di suini di età compresa tra pochi giorni di vita e 100 giorni provenienti da casi clinici manifestatisi principalmente durante il periodo post-svezzamento (80,7%), sottoscrofa (17,5%) e, anche se più raramente, all'ingrasso (1,8%). I visceri selezionati sono stati analizzati in piastre agar (Blood Agar Base, OXOID, Themofisher Scientific, UK) addizionate di sangue di montone al 3%. Dopo inoculo le piastre sono state incubate a 37 ± 1 °C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. Durante la lettura delle piastre di agar sangue, colonie sospette di *Streptococcus suis*, selezionate sulla base della loro morfologia e loro emolisi viridante (alpha- emolisi), sono state trapiantate su agar sangue per ulteriori analisi. Le colonie, con morfologia ed emolisi non tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a indagini biochimiche utilizzando la galleria miniaturizzata API Rapid ID 32 STREPT (bioMérieux, Francia). Le colonie che non presentavano profilo biochimico corrispondente a quello di *Streptococcus suis* sono state eliminate. Tra le colonie isolate, solamente quelle presentanti morfologia ed emolisi tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a test di sieroagglutinazione rapida su vetrino utilizzando sei antisieri commerciali (*Streptococcus suis* type serum 1, 2, 4, 7, 9, 12 – SSI Diagnostica, Statens Serum Institute, Danimarca).

Per verificare la sensibilità antibiotica di *Streptococcus suis* le colonie isolate, con morfologia ed emolisi tipiche, sono state sottoposte ad antibiogramma, utilizzando il metodo Kirby-Bauer (metodo della diffusione su piastra) nei confronti di diversi principi attivi. Tra questi quelli più utilizzati sono Ampicillina (OXOID), Amoxicillina (OXOID), Amoxicillina + Ac. clavulanico (OXOID) e Ceftiofur (OXOID). Altri antibiotici, meno o non utilizzati per il trattamento specifico delle patologie da Streptococco, quali Trimethoprim-sulfametossazolo (OXOID), Lincomicina (OXOID), Florfenicolo (Merck), Enrofloxacin (Bayer) e Doxyciclina (OXOID) sono stati egualmente testati per verificare un'eventuale variazione di sensibilità nel tempo, seppur in un arco temporale più breve. Dopo inoculo di colonie isolate in Mueller-Hinton brodo (OXOID) e incubazione a 37 ± 1 °C per quattro ore in condizioni di aerobiosi, la sospensione batterica è stata diluita per raggiungere la torbidità di 0,5 McFarland. Con tale sospensione, sono state inoculate piastre di Mueller-Hinton agar (OXOID) addizionate di sangue di montone al 3% ed incubate, in condizioni di aerobiosi, a 37 ± 1 °C per 4 ore. La valutazione degli aloni d'inibizione - così come la loro interpretazione (S-sensibile, I-intermedio, R-resistente) - è stata eseguita da lettore computerizzato SIRSCAN micro (I2A, Francia).

Gli isolati di *S. suis* sono stati analizzati in multiplex-PCR per la ricerca dei geni correlati

alla produzione di fattori di virulenza. In particolare sono stati ricercati i geni codificanti i polisaccaridi della capula *cps1* (per i sierotipi 1 e 14), *cps2* (per i sierotipi 2 e 1/2), *cps7* (per il sierotipo 7), *cps9* (per i sierotipo 9), i geni per la proteina EF e le sue varianti (*epf*, *epf**), i geni per la proteina sullisina (*sly*), i geni per la proteina MRP e le sue varianti (*mrp*, *mrp** and *mrp^s*), e il gene per la proteina arginina deaminasi (*arc*).

Il DNA batterico è stato estratto da 2 ml di brodo cultura utilizzando il kit “NucleoSpin 96 Tissue” kit (Macherey-Nagel) automatizzato sul biorobot “Microlab Starlets” (Hamilton). L’analisi di PCR è stata eseguita utilizzando il metodo di Silva *et al.* 2006, con la master mix “Multiplex PCR kit” (Qiagen) e la corsa è stata eseguita sul termociclatore “GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler” (Life Technologies). Gli ampliconi ottenuti sono infine stati analizzati in elettroforesi capillare con lo strumento “Qiaxcel multicapillary electrophoresis system” (Qiagen). La corsa elettroforetica è stata normalizzata con il marcatore di allineamento “Alignment Marker 50 bp/3 kb”, mentre la corrispondenza del peso delle bande ottenute con quello atteso è stata confermata con l’utilizzo del “DNA Molecular Weight Marker VIII” (Roche).

RISULTATI

Solo nove dei 57 isolati provenivano dalle scrofaie (siti 1) mentre tutti rimanenti, eccetto uno, provenivano da suini svezzati evidenziando come proprio questa sia la fase produttiva maggiormente colpita da questa patologia.

Nell’ 80,7% dei casi inviati per indagini di laboratorio *S. suis* è stato isolato da più organi - confermando quindi la forma setticemica - mentre nel 19,3% dei casi è stato isolato esclusivamente dal cervello (meningite). *S. suis* è stato isolato dai polmoni dei soggetti inviati al Laboratorio solo in 11 casi su 57 (19,3%) confermando come, almeno in queste fasi produttive, non sia un patogeno tipicamente respiratorio. Il sierotipo/tipo capsulare 9 è risultato quello più frequentemente isolato (31% dei casi). Il 50% degli isolati di sierotipo 9 hanno mostrato un profilo (patotipo) Arc/mrp/Sly + . Il secondo isolato più comune (22% dei casi) è stato il sierotipo 1 / 2, mentre il terzo è stato il sierotipo 4. Otto ceppi, pari al 14%, sono risultati non tipizzabili sia tramite PCR sia con gli antisieri specifici a disposizione del Laboratorio.

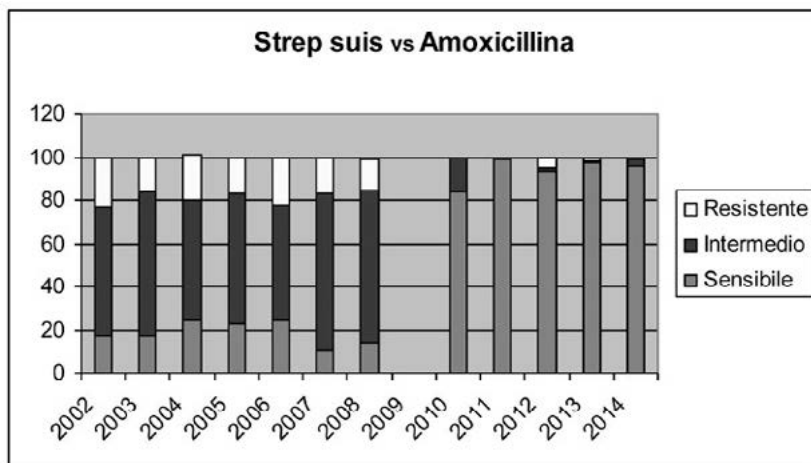
Tab.1/ Table 1

	N° casi	Correlazione con sieroagglutinazione	Arc-Mrp-Sly +
Sierotipo 1	5	3/5	40%
Sierotipo 2	5	3/5	40%
Sierotipo 1/2	13		38,4%
Sierotipo 4	6	Solo sieroagglutin.	50%
Sierotipo 7	1		
Sierotipo 9	18	17/18	50%
Sierotipo 11	1		
Non tipizzabili (NT)	8		12,5%

Ventidue isolati (38,6%), indipendentemente dal sierotipo di appartenenza, avevano un profilo completo Arc/mrp/Sly +.

E' interessante notare come I ceppi di *S. suis* isolati nel corso di questa indagine – così come quasi tutti quelli isolati dal nostro Laboratorio nel corso degli ultimi tredici anni – mostrino una limitatissima resistenza verso gli antibiotici Betalattamici tipo ampicillina (86-98% sensibilità) e amoxicillina (95-100% sensibilità).

Graf. 1/graph.1



Al contrario si è evidenziata un'elevata percentuale di resistenza nei confronti dell'associazione sulfamidico+ trimethoprim (>90% resistenti) e anche nei confronti di lincomicina (85-92% resistente). Includendo anche i valori di sensibilità intermedia anche ceftiofur (cefalosporine 3° generazione) ha dimostrato di mantenere una buona sensibilità nel tempo.

DISCUSSIONE

La definizione di ceppi virulenti di *S. suis* è molto controversa. Uno degli approcci proposti per identificare i ceppi come virulenti consiste nella differenziazione per tipo capsulare (polisaccaridi capsulari) e nella successiva identificazione dei fattori di virulenza associati. Tra questi Arginin-deaminasiA (ArcA), la Muramidase released Protein (MRP, mrp) e l'emolisina/suilysina (SLY, sly) sono quelli più comunemente accettati. E' allora possibile fare un'associazione tra patotipo e patogenicità intesa come espressione clinica dell'infezione? In base ai risultati di questa esperienza, che riteniamo significativa, seppur limitata nel tempo, possiamo dire che forme cliniche manifeste sono quasi sempre associate al rilevamento di alcuni o tutti i sopra citati fattori di virulenza. Solo in sette casi su 57 (12,3%) gli Streptococchi isolati non mostravano alcun fattore di virulenza tra quelli individuati dalla nostra PCR. Di questi sette isolati ben tre sono risultati non tipizzabili sia in PCR che con gli antisieri disponibili. E' invece difficile, almeno dal punto di vista statistico, dimostrare una correlazione univoca per sierotipo e/o patotipo intra filiera e tra le filiere. In tema di antibiotico sensibilità è incoraggiante vedere come i principi attivi più comunemente e frequentemente utilizzati siano rimasti "attivi" nel tempo.

CONCLUSIONI

Nonostante il sintomo clinico più frequentemente riportato sia la meningite, la grande maggioranza dei ceppi si è dimostrata in grado di essere molto invasiva essendo questi stati isolati da diversi organi/distretti anche quando non tutti i fattori di virulenza sono risultati presenti. Poiché nel tempo sono stati isolati sierotipi diversi nelle stesse filiere non è stato possibile dimostrare una correlazione univoca tra la scrofaia (sito 1) di origine e i rispettivi siti 2 in termini di sierotipo. Per poter efficacemente trattare i soggetti colpiti è fondamentale proseguire il monitoraggio nel tempo della sensibilità di *S. suis* nei confronti degli antibatterici, ma gli antibiotici betalattamici possono ancora essere considerati di prima scelta in caso di necessità. Le indicazioni emerse dalla nostra indagine rafforzano il nostro concetto di “diagnosi di filiera” almeno nel caso delle patologie causate da *Streptococcus* nella fase post svezzamento.

BIBLIOGRAFIA

Higgins R., Gottschalk M. “Streptococcal Diseases” in Diseases of Swine 8th Edition, Iowa State University Press

Baums CG. (2013) “Pathogenesis, diagnosis and prophylaxis of *Streptococcus suis* diseases” in: 19th Swine & Wine Meeting, Hamm-Kump, Germany, 25-27 October 2013

Silva L.M., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., Valentin-Weigand P. “Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR” *Vet Microbiol.* 2006 Jun 15;115(1-3):117-27.

Varela N.P., Gadbois P., Thibault C., Gottschalk M., Dick P., Wilson J. “Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*” *Anim Health Res Rev.* 2013 Jun;14(1):68-77.