

# PRESENZA DI MRSA NEI PARTECIPANTI AL MEETING SIPAS 2014

## *MRSA IN THE PARTICIPANTS IN THE MEETING SIPAS 2014*

DE FAVERI E.<sup>3</sup>, RIMOLDI S.<sup>2</sup>, PAGANI C.<sup>2</sup>, SALA V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica – Università di Milano;*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche “L. Sacco” – Università di Milano*

<sup>3</sup> *Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche – Università di Milano*

**Parole chiave:** MRSA, SIPAS 2014, suino, medico veterinario.

**Key words.** MRSA, SIPAS 2014, pig, veterinarian.

### **Riassunto**

È stato attivato uno studio diagnostico-epidemiologico per verificare la localizzazione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) nei partecipanti al Meeting della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini. 117 partecipanti si sono sottoposti volontariamente a tampone nasale previo consenso informato. La ricerca selettiva ha permesso l'isolamento di 49 ceppi di MRSA; gli stessi sono stati processati in rep-PCR insieme a 17 isolamenti da tonsille provenienti da suini al macello. Gli isolamenti sono stati classificati in 6 pattern genomici; in due di questi sono presenti isolamenti provenienti dalle due specie. Uno dei pattern, in particolare comprende 29 ceppi di derivazione umana e 12 di derivazione suina, a conferma della capacità di infezione interspecifica di MRSA. Sono state infine elaborate alcune osservazioni di natura epidemiologica sui risultati e le stesse hanno generato considerazioni sul rischio biologico e sulla sua prevenzione.

### **Summary**

A diagnostic study-epidemiological to verify the localization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the participants at the Meeting of the Italian Society of Pathology and Farming of Pigs (SIPAS) has been activated. 117 participants have voluntarily placed a nasal swab prior informed consent. 49 strains of MRSA have been selectively isolated; they have been processed in rep-PCR together with 17 isolates from tonsils of the slaughterhouse pigs and have been classified into 6 genomic patterns. In two of these isolates from the two species are present. One of the pattern comprises 29 human-derived strains and 12 of swine origin, confirming the ability of interspecies infection of MRSA. Some observations on the results of epidemiological study were developed and same considerations on biological risk and its prevention were finally generated.

### **INTRODUZIONE**

I primi ceppi resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati segnalati poco l'introduzione della meticillina nella pratica clinica, ma fino al 1980 la loro rilevanza è stata marginale (Brumfitt & Hamilton-Miller, 1989); solo in seguito, gli stafilococchi aurei meticillino-resistenti (MRSA) sono stati inseriti tra i principali agenti d'infezioni ospedaliere nel mondo. Oggi, negli Stati Uniti e in Europa fino al 30-50% degli stafilococchi aurei responsabili d'infezioni ospedaliere sono meticillino-resistenti (EARSS, 2008; NNIS, 2002) mentre nei Paesi Bassi e in Scandinavia i tassi di resistenza sono inferiori al 3%, grazie a piani di controllo e prevenzione correttamente gestiti.

In seguito, le popolazioni di MRSA sono state classificate in rapporto all'ambito di origine e/o di maggiore circolazione, distinguendo quindi *S. aureus* Healthcare-Acquired (HA), Community-Acquired (CA) e Livestock-Acquired (LA); sono questi ultimi che vedono coinvolti, con un ruolo epidemiologicamente decisivo, gli animali produttori di alimenti destinati all'uomo e che hanno generato l'ipotesi che la zootecnia intensiva possa essere, per la frequenza e l'intensità d'impiego dei trattamenti antibatterici, un ambito elettivo della selezione clonale delle antibiotico-resistenze.

La presenza di LA-MRSA nella produzione suinicola è oggi una certezza in molti Paesi e il suino è ormai considerato un potenziale serbatoio di trasmissione verso l'uomo e gli altri animali domestici; le sue più probabili funzioni epidemiologiche sarebbero la selezione delle varianti LA resistenti o addirittura la conservazione e la diffusione di quelle CA provenienti dall'uomo (Cui *et al.*, 2009; Wagenaar *et al.*, 2009).

Il contatto con i maiali è dunque ritenuto un fattore di rischio rilevante per la colonizzazione dell'uomo (Lewis *et al.*, 2008; Van Rijen *et al.*, 2008) al punto da assumere rilevanza socio-sanitaria in alcuni Paesi: in Olanda, la diffusione dei patotipi più frequenti nell'ambito zootecnico, in pratica nulla nel 2002, ha raggiunto il 21% nel 2006 (van Duijkeren *et al.*, 2008). Il fenomeno è certamente associato al contatto continuo con gli animali, poiché la colonizzazione riguarda particolarmente i veterinari, gli allevatori e i loro familiari.

Ciononostante, i fattori di rischio in suinicoltura sono stati indagati solo marginalmente: la continuità del lavoro a contatto con i suini è il principale, ma la qualità sanitaria del management può essere un fattore di amplificazione o riduzione.

Le indagini sulla localizzazione di MRSA nei veterinari hanno evidenziato una prevalenza relativamente elevata, sempre superiore a quella della popolazione generale; la mappatura dei cloni batterici ha confermato l'ipotesi dell'esposizione professionale in ippatria e nell'ispezione degli alimenti di origine animale (Anderson *et al.*, 2008; Christianson *et al.*, 2007) mentre non esistono indicazioni certe nei veterinari occupati in suinicoltura.

Ciò ha motivato l'indagine di cui riportiamo i primi risultati in questa nota; il lavoro ha interessato i partecipanti al Meeting annuale della Società di Patologia e Allevamento dei Suini; per una maggiore comprensione epidemiologica, sono stati mappati gli isolamenti, allo scopo di verificare la presenza dello stesso genotipo nel suino e nell'uomo e quindi una circolazione interspecifica favorita dal sistema di produzione.

## **MATERIALI E METODI**

Sono stati inclusi nello studio 117 partecipanti al Meeting annuale della Società di Patologia e Allevamento dei Suini, tenutosi a Montichiari (BS) nei giorni 27 e 28 marzo 2014. Il campione ha compreso Veterinari Aziendali, operanti nelle Aziende Sanitarie Locali e negli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, professionisti operanti per conto di Companies commerciali del settore suinicolo e tecnici aziendali. Il prelievo è avvenuto, previo consenso informato, mediante tampone nasale monolaterale.

Le procedure di campionamento sono state eseguite in osservanza dell'articolo 13 del Decreto Legislativo n° 106 del 30 giugno 2006 (Codice in materia di protezione dei dati personali); ogni individuo ha sottoscritto due moduli, fornendo il proprio consenso informato alla procedura e al trattamento dei dati personali. Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Milano.

Tutti i tamponi nasali sono stati eseguiti mediante tampone sterile monouso con terreno di trasporto tipo Ames W/OCH (Oxoid Italia); la manovra è stata eseguita in modo asettico e

non traumatico, evitando qualsiasi contatto contaminante. I tamponi sono stati immediatamente refrigerati (4-8°C) e in queste condizioni immediatamente trasportati al laboratorio d'analisi. Gli stipiti di derivazione suina appartengono invece alla collezione di MRSA del Laboratorio di Patologia Suina del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica e sono stati isolati da tonsille prelevate a suini normalmente processati in stabilimenti di macellazione dell'Italia settentrionale.

La ricerca selettiva di MRSA è stata eseguita dal laboratorio di Patologia Suina del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica dell'Università di Milano, mentre la successiva fase biomolecolare è stata condotta presso il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'Azienda Ospedaliera e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano. Qui di seguito sono schematizzate le fasi del processo.

#### Tamponi nasali

- Semina diretta in piastra su terreno MSA2 Gélose Chapman2 (Biomerieux, Francia) e su terreno selettivo Oxacillin-Salt Screen Agar (Biolife Italiana).
- Incubazione a 37°C per 18-24 ore.
- Lettura e interpretazione. MSA2: gli stafilococchi coagulasi-positivi (*S. aureus*) producono colonie con alone giallo, mentre i coagulasi-negativi hanno colonie bianche e non comportano viraggio del terreno Oxacillin-Salt Screen Agar: i ceppi di stafilococchi che crescono su questo terreno sono da considerare oxacillino-resistenti (la resistenza è estensibile alla meticillina e alla nafcillina). La valutazione crociata di crescita sui due terreni permette di individuare lo *S. aureus* meticillino resistente (MRSA)
- I ceppi isolati sono stati congelati a -20°C in glicerolo per una settimana e successivamente replicati su Tryptic Soy Agar (Biomerieux, Francia) prima dell'indagine biomolecolare.

#### Biologia molecolare

I ceppi meticillino-resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati analizzati mediante rep-PCR (DiversiLab System - Biomerieux, Francia) presso il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'A.O e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano; attraverso questa tecnica è possibile collocare gli isolamenti simili in pattern genotipici differenti tra loro.

La sua applicazione prevede tre passaggi successivi: l'estrazione del DNA batterico (tramite UltraClean® Microbial DNA Isolation kit - Biomerieux, Francia), la sua amplificazione mediante rep-PCR e il rilevamento dei DNA fingerprinting mediante elettroferogramma. Attraverso un software dedicato (DiversiLab - Biomerieux, Francia) si procede quindi alla comparazione dei fingerprint dei diversi campioni e alla loro catalogazione nei pattern.

## **RISULTATI E CONSIDERAZIONI**

### *Batteriologia*

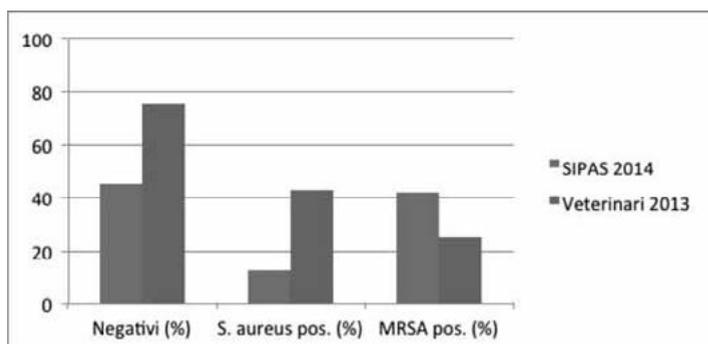
I risultati disponibili per quanto riguarda gli isolamenti di MRSA dai partecipanti al Meeting 2014 sono stati organizzati in Tabella 1; essi riguardano gli isolamenti dai tamponi nasali degli stessi e sono stati confrontati con quelli di una precedente indagine sperimentale, condotta su un numero minore di medici veterinari e già pubblicata in ambito internazionale (De Faveri *et al.*, 2014).

La maggiore numerosità del campionamento ha verosimilmente determinato una maggiore presenza del microrganismo indagato e, infatti, la percentuale di soggetti positivi è passata dal 25% della prima indagine a un ben più rilevante 41,9%. Questo dato, lungi dall'essere ultimativo, può comunque essere considerato indicativo della rilevanza del problema.

	Totali	Negativi	<i>S. aureus</i> pos.	MRSA pos.
SIPAS 2014	117	53	15	49
Veterinari 2013	28	21	12	7
	Negativi (%)	<i>S. aureus</i> pos. (%)	MRSA pos. (%)	
SIPAS 2014	45,3	12,8	41,9	
Veterinari 2013	75	42,8	25	

**Tabella 1.** Isolamenti di MRSA. Confronto tra due gruppi di campionamento.

**Table 1.** Isolation of MRSA. Comparison between two groups of sampling.



**Figura 1.** Valori percentuali nei due gruppi di campionamento.

**Figure 1.** Percentage values in the two sampling groups.

Pur considerando la relativa casualità del campione (i partecipanti al Meeting si sono sottoposti volontariamente al prelievo e quindi non è stato possibile stabilire preliminarmente la numerosità delle varie classi di età e di anni di occupazione in suinicoltura) alcune considerazioni possono essere proposte riguardo all'età e agli anni di attività nel settore suinicolo.

Sulla base dei dati di seguito organizzati (tabelle 2 e 3; figure 2 e 3) si può notare come MRSA sia diffusamente presente nei soggetti a vario titolo impiegati in suinicoltura e ciò avviene indipendentemente dall'età, dagli anni di occupazione nel settore, anche se esiste una corrispondenza tra il tempo effettivamente speso a stretto contatto con i suini, dato che i veterinari aziendali costituiscono il nucleo centrale delle positività.

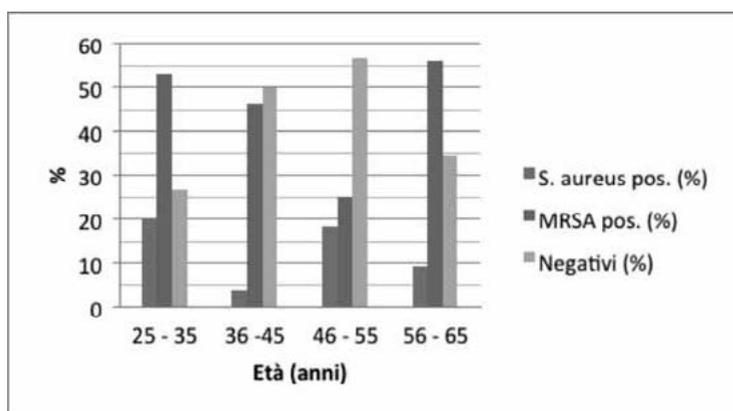
Età (anni)	<i>S. aureus</i> pos. (%)	MRSA pos. (%)	Negativi (%)
25 - 35	3 (20)	8 (53,3)	4 (26,7)
36 -45	1 (3,7)	12 (46,3)	13 (50)
46 - 55	8 (18,2)	11 (25)	25 (56,8)
56 - 65	3 (9,4)	18 (56,2)	11 (34,4)

**Tabella 2.** Positività per *S. aureus* e MRSA. Età dei soggetti campionati.

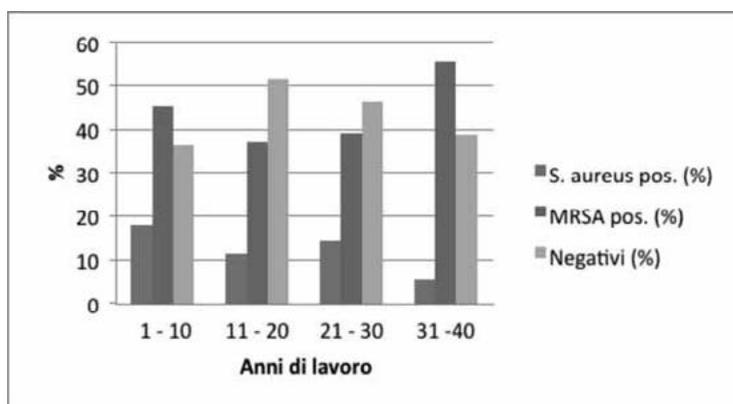
**Table 2.** *S. aureus* and MRSA positivity. Age of the sampled subjects.

Anni di lavoro	<i>S. aureus</i> pos. (%)	MRSA pos. (%)	Negativi (%)
1 - 10	4 (18,1)	10 (45,5)	8 (36,4)
11 - 20	4 (11,4)	13 (37,2)	18 (51,4)
21 - 30	6 (14,6)	16 (39)	19 (46,4)
31 -40	1 (5,5)	10 (55,6)	7 (38,9)

**Tabella 3.** Positività per *S. aureus* e MRSA. Anni di lavoro dei soggetti campionati.  
**Table 3.** *S. aureus* and MRSA positivity. Occupation years of the sampled subjects.



**Figura 2.** Valori percentuali nei gruppi rispetto all'età.  
**Figure 2.** Percentage values in the groups with respect to the age.



**Figura 3.** Valori percentuali nei gruppi rispetto agli anni di lavoro.  
**Figure 3.** Percentage values in the groups with respect to the years of work.

### Biologia molecolare

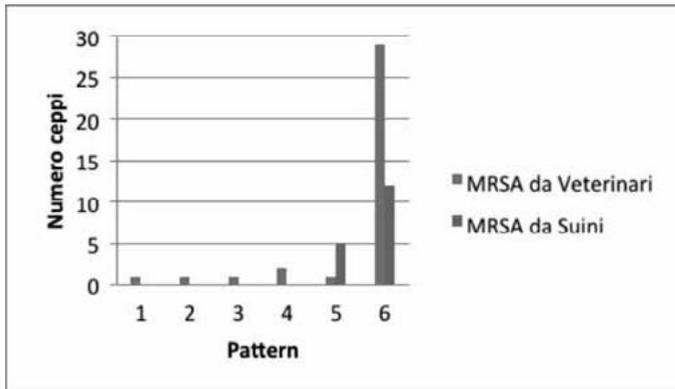
I risultati ottenuti mediante Diversilab sono organizzati in Tabella 4; sono stati sottoposti a rep-PCR 35 isolamenti da uomo e 17 da suino. Per maggiore chiarezza, ricordiamo qui che il sistema utilizzato permette di verificare il livello di similitudine del disegno genomico degli isolamenti, esprimendo una serie di “pattern” all’interno dei quali si collocano ceppi tra loro affini.

L’analisi mediante Diversilab li ha collocati in 6 pattern, all’interno dei quali si sono distribuiti come indicato in Tabella 2.

Pattern	N. isolamenti	Provenienza
1	1	Uomo
2	1	Uomo
3	1	Uomo
4	2	Uomo
5	6	1 Uomo, 5 Suino
6	41	29 Uomo, 12 Suino

**Tabella 4.** Suddivisione degli isolamenti nei pattern genomici.

**Table 4.** Breakdown of isolates among the genomic patterns.



**Figura 4.** Pattern di identificazione. Rappresentazione grafica.

**Figure 4.** Identification patterns. Graphical representation.

È evidente come il pattern 6 sia quello numericamente più consistente, comprendendo ben 41 isolamenti; stipti di MRSA provenienti sia dal suino, sia dell’uomo sono inoltre presenti anche nel pattern 5.

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

È prima di tutto chiaro che presenza e circolazione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) nelle comunità umane e nella produzione zootecnica intensiva sono ormai

da considerare assodate e, per certi versi, inevitabili; nell'ambito che abbiamo considerato e sul quale stiamo ancora operando (quello dell'esposizione occupazionale in suinicoltura) la prevalenza delle localizzazioni silenti è particolarmente elevata e non è azzardato affermare che, in assenza di misure specifiche, l'incidenza del problema è destinata ad aumentare nel tempo.

Infatti, sul campione esaminato in questo studio sperimentale, costituito da 117 medici veterinari e operatori del settore, ben 49 degli stessi (corrispondenti al 41,9% del campione) si sono rivelati portatori oro-nasali di MRSA; questa percentuale di positività, sicuramente superiore a quella segnalate in altre categorie umane esposte, rappresenta il dato più preoccupante, soprattutto in prospettiva.

Inoltre ben 30 isolamenti da uomo (sui 35 esaminati) si collocano nei pattern 5 e 6, unitamente a isolamenti da suino, mentre nei restanti quattro pattern si trovano cinque stiptipi di esclusiva derivazione umana; il significato epidemiologico di questi risultati è facilmente comprensibile, in termini di specificità o inter-specificità dei singoli cloni batterici. Quest'ultima caratteristica ha un importante effetto di potenziamento della diffusione e della capacità patogena di qualsiasi microrganismo e MRSA si è progressivamente espresso in questa direzione.

A conferma di quanto detto, si consideri il disegno del pattern numero 6, che comprende ben 29 isolamenti di derivazione umana e 12 da suini, tutti genomicamente simili. Nel nostro lavoro, abbiamo già dimostrato la diffusione degli stessi anche ai familiari dei medici veterinari, verificando l'importanza epidemiologica dei c.d. Livestock-Acquired MRSA e le modalità di diffusione degli stessi alla popolazione non professionalmente esposta.

La correlazione tra esposizione professionale e rischio biologico è un altro aspetto riguardo al quale le indagini epidemiologiche su MRSA possono avere una funzione dirimente; di conseguenza, rivedere il concetto di rischio biologico alla luce della modificazione evolutiva delle antibiotico-resistenze e della progressiva selezione dei cloni batterici circolanti sarà indispensabile, soprattutto in certi ambiti occupazionali e la suinicoltura intensiva è certamente uno di questi.

Nel caso di MRSA e dei nostri congressisti, il rischio non è direttamente correlabile né all'età, né agli anni di esposizione: è verosimile che ciò dipenda più dalle capacità di diffusione e permanenza del microrganismo che dall'attività dei soggetti a rischio. Semmai si può osservare che gli operatori che hanno iniziato più recentemente la loro attività hanno dovuto affrontare ceppi batterici oggettivamente più potenti in ambito di antibiotico-resistenza di quanto era accaduto, a suo tempo, ai colleghi più anziani; ciò non è ovviamente dimostrabile in termini sperimentali, ma quanto via via osservato negli studi epidemiologici delle antibiotico-resistenze rende realisticamente accettabile questa indicazione.

Quanto fin qui disponibile in termini di risultati, consente di accrescere la convinzione riguardo all'ipotesi che ha motivato il progetto di cui questo studio rappresenta una fase di avanzamento, vale a dire l'esistenza di un percorso epidemiologico delle antibiotico-resistenze, lungo il quale la selezione avviene in ambito animale e l'esposizione professionale dell'uomo legata a specifici fattori di rischio può rappresentare la via d'accesso alla circolazione interumana. Proseguire in questa direzione è l'obiettivo più immediato, considerando che MRSA è, tra i batteri antibiotico-resistenti, la causa preponderante di mortalità, non più e non soltanto in ambito ospedaliero, come avveniva fino a pochi anni fa; a più lunga scadenza, le finalità sono la rivalutazione del rischio biologico in zootecnia e la proposta di misure preventive da applicare da parte delle categorie a rischio.

Gli operatori del settore suinicolo fanno certamente parte di queste e non solo nel caso di

MRSA: aumentare coscienza e conoscenza del problema è certamente il primo passaggio, ma provvedere all'elaborazione di linee guida condivise, è un obiettivo sempre più irrinunciabile.

## BIBLIOGRAFIA

- Anderson M.E., Lefebvre S.L., Weese J.S. (2008). Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Vet. Microbiol.* 129:410-417.
- Cui S., Li J., Hu C., Jin S., Li F., Guo Y., Ran L., Ma Y. (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:680-683.
- de Neeling A., van den Broek M., Spalburg E., van Santen-Verheувel M., Dam-Deisz W., Boshuizen H., van de Giessen A., van Duijkeren E., Huijsdens X. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122:366-372.
- De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V. (2014). Interspecific epidemiology of MRSA in pig. *Farming. J Infect Dis Ther.* 2:2 <http://dx.doi.org/10.4172/2332-0877.1000135>
- Denis O., Suetens C., Hallin M., Catry B., Ramboer I., Dispas M., Willems G., Gordts B., Butaye P., Struelens M.J. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infect. Dis.* 15:1098-1101.
- Huijsdens X., van Dijke B., Spalburg E., van Santen-Verheувel M., Heck M., Pluister G., Voss A., Wannet W., de Neeling A. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:26.
- Khanna T., Friendship R., Dewey C., Weese J.S. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.* 128:298-303.
- Lewis H.C., Mølbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau M., Sørum M., Skov R.L. (2008). Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cc398 infections in humans, Denmark. *Emerging. Infect. Dis.* 14:1383-1389.
- van Rijen M.M., Bosch T., Heck M.E., Kluytmans J.A. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and transmission in a Dutch hospital. *J. Hosp. Infect.* 72:299-306.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging. Infect. Dis.* 11:1965-1966.
- Wagenaar J.A., Yue H., Pritchard J., Broekhuizen-Stins M., Huijsdens X., Mevius D.J., Bosch T., van Duijkeren E. (2009). Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet. Microbiol.* 139:405-409.