

# STUDIO PRELIMINARE SULLA DIFFUSIONE DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO-RESISTENTE NELLA FILIERA SUINA

## ***METHICILLIN - RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN PIG PRODUCTION CHAIN***

Conter M.<sup>1</sup>, Di Ciccio P.<sup>1</sup>, Zanardi E.<sup>1</sup>, Ghidini S.<sup>1</sup>, Borracci G.<sup>1</sup>, Vergara A.<sup>2</sup>, Ianieri A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti-Università degli Studi di Parma.

<sup>2</sup>Dipartimento Scienze degli Alimenti – Università degli studi di Teramo.

### SUMMARY

The aims of this study were (i) to estimate the prevalence of *Staphylococcus aureus* (*S.a*) in pig farm environments; (ii) to evaluate the presence of *S.a* in pork processing environments (iii) to detect the presence of methicillin-resistant (MRSA) among isolated strains. Samples of pig stool, farm environment and pork processing environment were collected. These samples were submitted to detection of *S.a* following the international method: UNI EN ISO 6888-2 and the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) tests were performed by using the automated VITEK 2 system. In addition, a PCR for the detection of the *mecA* gene was applied. Overall, *S. aureus* were more frequently detected from pig farms than from pork processing environments. Among the n.51 isolated strains, n. 49 (96%) were methicillin resistant (MRSA) and only n.2 strains were methicillin sensitive (MSSA). The results of the present study highlighted that further studies are needed to elucidate transmission routes of MRSA in pig production chain.

### KEYWORDS

*Staphylococcus aureus*, MRSA strains, pig production chain.

### INTRODUZIONE

*Staphylococcus aureus* (*S.a*) responsabile di setticemie e infezioni a carico di cute, apparato respiratorio e tessuti molli, rappresenta anche una delle principali cause di tossinfezione alimentare (1). Una importante ed attuale problematica sanitaria legata a *S.a* è la presenza di ceppi resistenti a diversi antibiotici ed in maniera particolare alla meticillina. Il meccanismo principale attraverso il quale i ceppi di *S.a* diventano MRSA è l'acquisizione del gene *mecA* che codifica una proteina di membrana alterata denominata *Penicillin Binding Protein 2* (PBP2a), caratterizzata da una bassa affinità per la maggior parte dei  $\beta$ -lattamici (2). Le infezioni sostenute da MRSA sono riportate in letteratura da oltre 40 anni, tuttavia nell'ultimo decennio l'aspetto epidemiologico ha subito pro-

fonde modificazioni; le infezioni non sono più confinate all'ambiente ospedaliero (*hospital acquired* MRSA, HA-MRSA), ma compaiono con crescente frequenza in soggetti non ospedalizzati né esposti a particolari fattori di rischio (*community-acquired* MRSA, CA-MRSA) (3). Recentemente, inoltre, nel bestiame e in particolare nell'allevamento suinicolo, sono stati isolati ceppi appartenenti al complesso clonale CC398, geneticamente non correlato ai precedenti e caratterizzato da una bassa ospite specificità e a rapida diffusione (*livestock-associated* MRSA, LA-MRSA). Studi olandesi sulla prevalenza in allevamenti suini di MRSA evidenziano una positività che varia dal 23 all'81%, mentre la prevalenza nei singoli suini varia tra l'11 e il 39%. Dopo l'iniziale isolamento in Olanda, anche Belgio, Danimarca, Germania, Francia, USA e Canada riportano l'isolamento di MRSA

in allevamenti suini; sebbene via sia da sottolineare una grande variabilità tra le percentuali riscontrate (4, 5, 6, 7, 8). In un recente *Report* del 2009 (9), "The European Food Safety Authority" (EFSA) evidenzia come i dati relativi agli MRSA presenti negli allevamenti suini siano a livello europeo limitati. L'ingresso di questi batteri all'interno della catena di trasformazione, sfruttando come veicolo gli animali contaminati è uno dei rischi maggiori per la contaminazione delle carni ad opera dei ceppi MRSA incluso il complesso clonale CC398. Gli obiettivi del presente lavoro sono stati:

- (i) valutare la diffusione di *S.a* in ambienti di allevamenti suini presenti sul territorio parmense;
- (ii) valutare la presenza di *S.a* negli ambienti degli stabilimenti di lavorazione delle carni;
- (iii) individuare la presenza di MRSA tra i ceppi isolati.

## MATERIALI E METODI

Nel complesso sono stati raccolti n.141 campioni da allevamenti suini e stabilimenti di lavorazione delle carni. In particolare, sono stati campionati: n.6 allevamenti intensivi, dai quali sono stati raccolti n. 64 campioni (feci e ambienti) e n.2 stabilimenti per la lavorazione delle carni dai quali sono stati effettuati n.77 campioni nel corso di campionamenti successivi (superfici ed attrezzature). Per ciascun allevamento è stato raccolto un campione di un *pool* di feci provenienti da 2/3 box, a seconda delle dimensioni dell'allevamento stesso; mediante *sponge-bag* preventivamente reidratate con 10 ml di soluzione di Ringer sono state saggiate, inoltre, le pareti dei box interni, le pareti dei box esterni e le superfici interne delle mangiatoie. I campionamenti ambientali, presso gli stabilimenti di lavorazione carni, sono stati eseguiti, sempre utilizzando *sponge bag*, adottando le modalità su descritte. Tutti i campioni sono stati processati in accordo alla metodica: UNI EN ISO 6888-2. I ceppi isolati sono stati sottoposti ad identificazione biochimica mediante sistema automatizzato VITEK2 compact (bioMérieux). La ricerca del 16S rRNA (*Staphylococcus* genere specifico) e del gene *nuc* (*S. aureus* specie-specifico) è stata eseguita mediante multiplex PCR secondo i protocolli di Geha *et al.* e Brakstad *et al.* da noi modificati (10, 11). I ceppi assegnati alla specie *S.a* sono stati, infine, saggiati per la meticillino-resistenza con metodiche fenotipiche mediante determinazione della MIC con sistema VITEK2 compact (bioMérieux) e genotipiche mediante PCR per l'identificazione del gene *mec-A* seguendo il protocollo di D'Orio *et al.*, (12).

## RISULTATI

Dai n.141 campioni analizzati sono stati isolati n.51 *S.a* (36,2%). In particolare, n.50 ceppi di *S.a* sono stati isolati dai campioni provenienti dagli allevamenti (78,1%) mentre un solo ceppo di *S.a* è stato isolato dai campioni raccolti presso gli stabilimenti di lavorazione (1,3%). Nel complesso n.49 isolati (96%), provenienti tutti dagli allevamenti, sono risultati essere *mec-A* positivi, mentre n.2, uno da campioni provenienti dagli allevamenti e uno da stabilimenti di produzione sono risultati *mec-A* negativi. Per quanto riguarda la determinazione della MIC per l'oxacillina, n.44 ceppi hanno mostrato un fenotipo di resistenza mentre n.7 ceppi (n.6 ceppi provenienti da allevamenti e n. 1 da stabilimenti di lavorazione) non sono risultati fenotipicamente resistenti.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nel complesso è possibile affermare che la prevalenza di MRSA negli allevamenti suini è considerevole. I test per la presenza del gene *mec-A* sono i metodi più accurati per poter stabilire se un ceppo mostra o meno resistenza alla meticillina (oxacillina). Anche se l'espressione del gene *mec-A* è considerato il principale meccanismo di resistenza alla meticillina negli stafilococchi, altri meccanismi da soli o in combinazione, sono stati rilevati nei ceppi di *S.a*. Per esempio, la resistenza alla meticillina in ceppi, *mecA*-negativi può essere legata ad una iperproduzione di  $\beta$ -lattamasi, alla produzione di una PBP con bassa affinità di legame e/o ad altri fattori non ancora identificati (2). I ceppi negativi alla ricerca del gene *mec-A*, pertanto, dovrebbero essere considerati meticillino-sensibili (MSSA) solo se alla determinazione della MIC presentano valori  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  mentre MRSA se tali valori sono  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ . L'identificazione del gene *mec-A*, in combinazione con la determinazione della MIC, sono tecniche in grado di fornire dati attendibili sulla meticillino-resistenza (13). In questo studio dei 49 isolati che veicolano il gene *mec-A*, 44 erano fenotipicamente resistenti all'oxacillina, ma 5 ceppi mostravano, al contrario, sensibilità a questa molecola. Questi isolati, con ogni probabilità, sono ceppi etero-resistenti, in cui meno di 1 cellula batterica su 100.000 è altamente resistente alla meticillina (2). Secondo l'interpretazione fornita dal CLSI (2006) è possibile concludere che, in questo studio, il 96% dei ceppi è potenzialmente MRSA. La percentuale di positività da noi riscontrata in paragone ad altri dati nazionali appare notevolmente più elevata (14); anche se è da considerare che in questa fase preliminare del nostro studio è

stato saggiato solo un numero limitato di allevamenti. L'ulteriore fase di sviluppo del nostro studio prevede, in quanto di fondamentale importanza sia dal punto di vista epidemiologico che per la fonte di infezione, la tipizzazione molecolare dei ceppi MRSA rinvenuti nei vari campioni. In conclusione una conoscenza più approfondita delle prevalenze e delle vie di trasmissione di ceppi MRSA nella catena alimentare potrebbe, sicuramente, fornire gli strumenti utili per prevenire la loro diffusione e per poter effettuare una corretta valutazione del rischio per salvaguardare la salute dei consumatori così come sottolineato dal "Report" dell'EFSA (2009): "Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods" (15).

## BIBLIOGRAFIA -

1. Kerouanton, A.; Hennekinne, J.A.; Letertre, C.; Petit, L.; Chesneau, O.; Brisabois, A.; de Busier, M.L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115 (3), 369-375
2. Baddour, L.M.; AbuEIKheir, M.M.; Fatani, A.J. (2007). Comparison of *mecA* Polymerase Chain Reaction with phenotypic methods for the detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 55,473-479
3. Chambers, H.F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Review*, 10, 781-791
4. Broens, E.M.; van Cleef, B.A.G.L.; Graat, E.A.M.; Kluytmans, A.J.W. (2008). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from food production animals to humans: a review. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3, 1-12
5. Schwarz, S.; Kadlec, K.; Strommenger, B. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004–2006 in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 282-285
6. Kadlec, K.; Ehrlich, R.; Monecke, S.; Steinacker, U.; Kaspar, H.; Mankertz, J.; Schwarz, S. (2009). Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1156-1164
7. Meemken, D.; Blaha, T.; Tegeler, R.; Tenhagen, B.A.; Guerra, B.; Hammerl, J.A.; Hertwig, S.; Kasbohrer, A.; Appel, B.; Fetsch, A. (2009). Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LaMRSA) isolated from lesions of pigs at necropsy in Northwest Germany between 2004 and 2007. *Zoonoses and Public Health*, 57, 143-148
8. Golding, G.R.; Bryden, L.; Levett, P.N.; McDonald, R.R.; Wong, A.; Wylie, J.; Graham, M.R.; Tyler, S.; Van Domselaar, G.; Simor, A.E.; Gravel, D.; Mulvey, M.R. (2010). Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 587-594
9. EFSA (European Food Safety Authority), (2009)a. 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; on request from the European Commission. *EFSA Journal*, 7(11), 1376
10. Geha, D.L.; Uhl, J.R.; Gustaferrero, C.A.; Persing, D.H. (1994). Multiplex detection for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1768-1772
11. Brakstad, O.G.; Aasbakk, K.; Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1654-1660
12. D'Orio, V.; Festino, A. R.; Costanzo, C.; Di Ciccio, P.; Colavita, G.; Vergara, A. (2008). Identificazione biomolecolare di ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) isolati da matrici carnee e da ambienti di produzione. *Rivista dell'Associazione Italiana dei Veterinari Igienisti (Aivi)*, 1.1/08, 35-38
13. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; *Sixteenth informational supplement M100-S16*, Vol 26 (3)
14. Battisti, A.; Franco, A.; Meriardi, G.; Hasmanc, H.; Iurescia, M.; Lorenzetti, R.; Feltrin, F.; Zini, M.; Aarestrup, F.M. (2010). Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Veterinary Microbiology*, 142, 361-366

15. EFSA (European Food Safety Authority), (2009)b. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the

Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal*, 993, 1-73