

DETERMINAZIONE DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA IN STAFILOCOCCI COAGULASI POSITIVI ISOLATI DA LATTE DI PECORA

EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCUS ISOLATED FROM SHEEP MILK

Loi I, Preziuso S, Attili AR, Valente C¹, Cuteri V Dipartimento Scienze Veterinarie, Camerino; ¹Dipartimento Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Perugia

Parole chiave: *S. aureus*, *S. intermedius*, antibiotico resistenza, latte, pecora

Key words: *S. aureus*, *S. intermedius*, antibiotic resistance, milk, sheep

SUMMARY – *S. aureus* is the most frequent bacteria isolated from subclinical mastitis in sheep. For the presence of multiresistant bacteria in many cases there is a failure of therapy. Aims of the work were to isolate and to identify *S. aureus* and *S. intermedius* from milk of mastitis affected sheep, to evaluate the methicillin-resistance (MRSA), and to determine the epidemiological role of sheep in spreading these bacteria. 1.100 milk samples were collected. From 500 samples staphylococci were isolated (45,45%), identified by PCR and submitted to antibiotic susceptibility test. 91 were *S. aureus* (18,20%), 7 *S. intermedius* (1,40%) and none showed the *mecA* gene. Many strains were resistant to vancomycin, clindamicin and eritromycin. In conclusion the most frequent bacteria isolated were staphylococci that would be better identified by PCR to distinguish between *S. aureus* and *S. intermedius*. For the different sensitivity to antibiotic, treatments would be guided by a laboratory response.

INTRODUZIONE - La mastite nell'ovino è solitamente causata da numerosi microrganismi, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mannheimia haemolytica*, da batteri della Fam. *Enterobacteriaceae* e occasionalmente da miceti e lieviti. Ognuno di questi agenti eziologici determina sintomi e lesioni diversi che, in base alle caratteristiche del microrganismo, possono coinvolgere o meno alcuni quartieri o tutta la mammella. Il germe più frequentemente isolato è *S. aureus* (1, 2, 3).

La terapia nei confronti di *S. aureus* è condizionata dalle caratteristiche cliniche del processo morboso. In corso di mastite subclinica e cronica sono di uso comune penicilline semisintetiche, cefalosporine e tetracicline somministrate per via diatetica. Nella forma gangrenosa è necessario associare anche frequenti mungiture per allontanare il materiale essudatizio dalla mammella e una terapia sistemica per contrastare la tossiemia (2).

In molti casi si assiste ad un insuccesso del trattamento antibiotico per la presenza di ceppi multi-resistenti. Una maggiore efficacia potrebbe scaturire dall'impiego di farmaci scelti sulla base dell'antibiogramma(1, 5).

S. intermedius, appartenente al gruppo degli stafilococchi coagulasi positivi, spesso non viene identificato a causa delle notevoli analogie con *S. aureus*. *S. intermedius*, nonostante si comporti da saprofita su cute e mucose, è capace di determinare, a seguito di traumatismi o abbassamento delle difese immunitarie, rilevanti patologie in medicina veterinaria. Per questo germe, ritenuto di scarsa importanza in medicina umana, è stato evidenziato l'aumento dei casi di resistenza agli antibiotici β -lattamici tanto da costringere gli addetti del settore a coniare una apposita denominazione, MRSI (*Methicillin Resistant Staphylococcus Intermedius*) (4).

Scopo del lavoro è stato quello di isolare ed identificare ceppi di *S. aureus* e *S. intermedius* dal latte di pecore affette da mastite subclinica, di valutare, attraverso metodi fenotipici e genotipici, la presenza di meticillino-resistenza (MRSA), e di determinare quindi il ruolo della pecora nella problematica epidemiologica di questi batteri.

MATERIALI E METODI – La sperimentazione ha riguardato cinque diversi allevamenti del Centro Italia con una consistenza numerica variabile da trecento a circa millecinquecento capi di razza Sarda. Gli animali sono stati selezionati e sottoposti agli accertamenti batteriologici sulla base all'esito della conta delle cellule somatiche del latte effettuata periodicamente dalle associazioni di categoria.

Il campionamento del latte, costituito da un pool delle due emimammelle, è stato effettuato tra Gennaio 2006 e Marzo 2007. Sono stati controllati 1.100 campioni prelevati da pecore con mastite subclinica. Ogni campione di latte è stato sottoposto ad esame batteriologico, seguendo le indicazioni del National Mastitis Council. Una volta eseguita la semina su Nutrient Agar con aggiunta del 5% di sangue ovino e Mannitol Salt Agar (MSA) (Oxoid, Milano, Italia), le piastre sono state poste in incubatore alla temperatura di 37 °C per 48 ore. Dalle colonie isolate riportabili a batteri del genere *Staphylococcus* si è proceduto con l'iter di identificazione di specie eseguendo la prova della catalasi e del clumping factor. I batteri risultati catalasi e clumping factor positivi sono stati trapiantati su Müller Hinton Agar (MH) (Oxoid, Milano, Italia), ed incubati a 37 °C per ventiquattro ore (1, 5). Cinque colonie monocito genetiche sono state disciolte in 50 μ l di una soluzione contenente lisozima e sottoposte ad estrazione del DNA con metodo lisozima/proteinasi K (9). Il DNA ottenuto è stato utilizzato per l'identificazione di *S. aureus* e di *S. intermedius* mediante multiplex PCR (6). Oltre ad

includere un controllo interno specifico per un tratto del 16SrRNA di *Staphylococcus* spp., i primer utilizzati permettevano la distinzione di *S. aureus* e *S. intermedius* in base alla diversa lunghezza di un tratto del gene *nuc*. La reazione di PCR è stata effettuata secondo il mix suggerito da Lautz et al. (2006), utilizzando 50 µl di taq PCR master mix (Qiagen, Hilden, Germany) ed una concentrazione finale di MgCl₂ pari a 2,5 mM. La presenza dei geni *mecA* per la resistenza alla meticillina è stata valutata mediante single-PCR utilizzando i primer *mecA1* e *mecA2* descritti da Strommenger et al. (2003), ad una concentrazione finale di 0.4µM. In entrambe le PCR venivano testati 2µl del DNA estratto ed il protocollo di amplificazione consisteva in: 95°C per 4 min, 35 x (95°C per 1 min, 55°C per 1 min, 72°C per 1 min), 72°C per 7 min. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2% con l'aggiunta di bromuro d'etidio.

Una sospensione batterica è stata utilizzata per l'antibiogramma, che è stato eseguito secondo il metodo Kirby-Bauer impiegando i seguenti antibiotici: clindamicina, eritromicina, gentamicina, meticillina, ossitetraciclina, vancomicina e quinopristina. La scelta degli antibiotici è stata fatta in base a dati bibliografici e tenendo conto di quegli antibiotici verso i quali negli ultimi anni si è riscontrata una maggiore resistenza o perché, come nel caso di quinopristina, rappresentano gli antibiotici di ultima generazione utilizzabili solo in caso di multi resistenza.

RISULTATI - Dai mille e cento campioni di latte esaminati sono stati identificati 500 (45,45%) microrganismi presumibilmente appartenenti al genere *Staphylococcus*.

I 500 ceppi isolati oltre a presentare le comuni caratteristiche dei batteri del genere *Staphylococcus*, erano in grado di sviluppare sul terreno selettivo MSA, di fermentare il mannitolo ed erano tutti positivi al test della catalasi. Di questi 500 ceppi, 98 (19,6%) hanno mostrato positività anche al test del clumping factor e pertanto sono risultati riferibili a *S. aureus* o a *S. intermedius*.

I risultati biomolecolari hanno confermato che i 500 ceppi isolati appartenevano al genere *Staphylococcus*, in quanto la PCR su questi campioni ha evidenziato una banda di 252 pb corrispondente al tratto atteso del 16SrRNA. In 91 campioni, oltre al controllo interno, è stata ottenuta una banda di 420 pb, attesa per *S. aureus*. In 7 casi è stata evidenziata una banda di 125 pb corrispondente al tratto *nuc* di *S. intermedius*. In nessun campione di *S. aureus* o *S. intermedius* è stata evidenziata la banda di 532 pb corrispondente al tratto *mecA*.

I risultati degli antibiogrammi eseguiti per ogni ceppo di *S. aureus* e *S. intermedius* sono riportati in tabella 1.

DISCUSSIONE - La mastite nell'ovino è un evento frequente ed è causa di gravi perdite economiche per l'allevatore. In molti casi, come nel bovino, si tratta di mastite subclinica e solo raramente si assiste a focolai caratterizzati dalla tipica forma di mastite gangrenosa che esita nella perdita della mammella e talvolta nella morte dell'animale.

Dai risultati ottenuti si può confermare che la mastite subclinica dell'ovino, come per il bovino, sia sostenuta prevalentemente da batteri del genere *Staphylococcus* (45,45%). Inoltre nella indagine svolta, la prevalenza della mastite subclinica da *S. aureus* è stata dell'8,27%, sovrapponibile a quella riscontrata in indagini analoghe svolte nel nostro Paese (8).

In merito alla possibilità di identificare *S. aureus* mediante il solo test della coagulasi, è stato confermato che in 7 casi si trattava di un risultato falso positivo, riuscendo con la PCR ad identificare *S. intermedius*. Questo risultato conferma che le due specie hanno caratteristiche biochimiche e morfologiche sovrapponibili e che solo indagini molecolari, con più elevata specificità, sono in grado di differenziarle. A tal proposito sarebbe quindi auspicabile una identificazione di specie routinariamente eseguita con la PCR, che grazie anche a costi contenuti, rispetto alle gallerie biochimiche, eviterebbe questi errori diagnostici.

Tabella 1. Risultati dell'antibiogramma

Antibiotico	Sensibile		Intermedio		Resistente	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>Clindamicina</i>	7,8%	0%	73,3%	57,1%	18,9%	42,9%
<i>Eritromicina</i>	63,4%	28,55%	20%	28,55%	16,6%	42,9%
<i>Gentamicina</i>	90%	85,7%	2,3%	0%	7,7%	14,3%
<i>Meticillina</i>	88,8%	100%	7,8%	0%	3,4%	0%
<i>Ossitetraciclina</i>	61,1%	0%	26,7%	0%	12,2%	100%

Vancomicina	62,6%	57,1%	NP	NP	37,4%	42,9%
Quinopristina	72,2%	85,7%	22,2%	14,3%	5,6%	0%

NP: risultato non previsto

I risultati degli antibiogrammi hanno evidenziato una elevata resistenza sia di *S. aureus* che di *S. intermedius* alla vancomicina, confermando una reale emergenza anche in medicina veterinaria. Solo 3 ceppi di *S. aureus* e nessuno di *S. intermedius* sono risultati resistenti alla meticillina, ma non essendo stato riscontrato il gene *mecA*, secondo quanto previsto dalla letteratura internazionale, non è possibile considerare MRSA questi ceppi. Tale resistenza, pur rimanendo valida a fini terapeutici, potrebbe essere attribuita ad ulteriori fattori quali la produzione di biofilm o la presenza di altri meccanismi o geni non ancora identificati.

Le stesse conclusioni possono essere tratte in merito alla elevata resistenza riscontrata con l'antibiogramma nei confronti di clindamicina ed eritromicina.

In conclusione, alla luce dei risultati di questa indagine svolta in allevamenti di pecore ad elevata produzione di latte, è possibile affermare che i batteri che ricorrono con maggiore frequenza sono gli stafilococchi i quali andrebbero meglio identificati nell'ambito del genere, con le metodiche biomolecolari.

Inoltre, a causa della diversa sensibilità agli antibiotici, i trattamenti terapeutici dovrebbero essere sistematicamente pilotati dagli antibiogrammi in modo da ottenere una migliore risoluzione della infiammazioni evitando anche l'insorgenza di stipiti di *S. aureus* che oltre a complicare la terapia nell'animale potrebbero rappresentare un pericolo per l'uomo

BIBLIOGRAFIA - Cuteri V et al (2002) Infect Med, 1, 25-30. 2) Leonard LA et al (2006) Vet Rec, 158, 155-159. 3) Normanno G et al (2007) Int J Food Microbiol, 117, 219-222. 4) El Zubeir IEM et al (2007) Vet Microbiol, 121, 170-176. 5) Cuteri V et al (2005) JAVA, 4,1000-1003. 6) Baron F et al (2004) J Food Prot, 67, 2302-2305. 7) Strommenger B et al (2003) J Clin Microbiol, 41, 4089-4094. 8) Moroni P et al (2007) J Dairy Res, 74, 340-344. 9) Alber J et al (2004) J Vet Med, 51, 45. 10) Lantz S et al (2006) J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 53 434-438.