

# DIFFUSIONE DI CLONI DI *STREPTOCOCCUS SUIIS* SIEROTIPO 9 CARATTERIZZATI DA UNA RIDOTTA SENSIBILITÀ AI BETA LATTAMICI IN ITALIA

## ***SPREAD OF STREPTOCOCCUS SUIIS SEROTYPE 9 STRAINS CHARACTERIZED BY A REDUCED SUSCEPTIBILITY TO BETA-LACTAMS IN ITALIAN PIG FARMS***

CUCCO L.<sup>1</sup>, MASSACCI F.R.<sup>1</sup>, PANICCIÀ M.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>2</sup>, ALBINI E.<sup>1</sup>, FERRONI L.<sup>1</sup>; USTULIN M.<sup>3</sup>, PERUZZO A.<sup>3</sup>, ORSINI M.<sup>3</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati'

<sup>2</sup> Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

<sup>3</sup> Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, sierotipo 9, beta-lattamici

**Keywords:** *Streptococcus suis*, serotype 9, beta-lactams

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, Penicillin Binding Protein, Sequence Type

**Keywords:** *Streptococcus suis*, Penicillin Binding Protein, Sequence Type

### RIASSUNTO

*Streptococcus suis* è uno dei più importanti patogeni del suino ed un agente di zoonosi. In uno studio precedente abbiamo descritto un incremento delle infezioni da *S. suis* sierotipo 9 (SS9) negli allevamenti in Italia. Un elevato numero di isolati apparteneva al *sequence type* (ST) 123, e presentava una ridotta sensibilità alla penicillina. Scopo di questo lavoro è stato indagare l'andamento della sensibilità ai beta-lattamici di SS9 in Italia dal 2002 al 2021. Abbiamo analizzato 66 isolati di SS9 da casi clinici di streptococcosi, definendone ST, sensibilità agli antibiotici, presenza di geni di antibiotico-resistenza e virulenza e sostituzioni a carico delle *Penicillin Binding Protein* (PBP). I genomi degli isolati italiani sono stati confrontati con quelli di SS9 disponibili nelle banche dati. Gli ST più frequenti sono stati ST123 e ST16, che differivano in termini di fattori di virulenza e di sensibilità ai beta-lattamici. Gli isolati appartenenti al ST123, ST1954 e ST94 erano nello stesso gruppo filogenetico di isolati spagnoli, e distinti da isolati di altra origine. Una ridotta sensibilità si è osservata non solo alla penicillina, ma anche a ceftiofur e ampicillina, in questo caso senza arrivare ad una resistenza clinica. La sensibilità a penicillina si è ridotta nel corso del periodo di osservazione, ed era associata ai ST123, ST1540 e ST1953. I ceppi caratterizzati da una bassa sensibilità ai beta-lattamici presentavano una caratteristica struttura a mosaico delle PBP. Il lavoro indica che la sensibilità alla penicillina di SS9 si sta progressivamente riducendo negli allevamenti italiani grazie all'espansione di alcuni cloni batterici, probabilmente a causa della pressione selettiva generata dall'impiego di antibiotici.

### ABSTRACT

*Streptococcus suis* is one of the most important swine pathogens and an emerging zoonotic agent. In a previous study we described an increase of *S. suis* serotype 9 (SS9) infections in pig herds in Italy: most isolates belonged to sequence type (ST) 123, and were characterized by a reduced sensitivity to penicillin. The aim of this work was to investigate the trend of sensitivity to beta-lactams of SS9 in Italy from 2002 to 2021. We analysed 66 isolates of SS9 isolated from clinical cases of streptococcosis, in terms of ST, sensitivity to antibiotics,

presence of genes coding for antibiotic resistance and virulence and substitutions in the Penicillin Binding Protein (PBP). The genomes of the Italian isolates were compared with the SS9 genomes available in public repositories. The most frequent STs were ST123 and ST16, which differed in terms of virulence factors and sensitivity to beta-lactams. The isolates belonging to ST123, ST1954 and ST94 clustered together in the same phylogenetic group with isolates from Spain, and distinct from isolates of other origin. A reduced susceptibility was observed not only to penicillin, but also to ceftiofur and ampicillin, without reaching clinical resistance. The susceptibility to penicillin decreased over the observation period, and was associated with ST123, ST1540 and ST1953. Strains characterized by low susceptibility to beta-lactams showed a characteristic mosaic structure of the PBPs. In conclusion, the susceptibility to penicillin of SS9 is progressively decreasing in Italian herds, coupled with the spread of some bacterial clones. This phenomenon is probably favoured by the use of antibiotics.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* è riconosciuto in tutto il mondo come un patogeno suino associato a diverse condizioni cliniche quali meningite, artrite, endocardite o setticemia. Si tratta anche di un microrganismo zoonotico responsabile di setticemia, endocardite e meningite nell'uomo (Zheng et al., 2018). Si riconoscono 29 sierotipi di *S. suis*, caratterizzati da diversa patogenicità; *S. suis* sierotipo 2 (SS2) è considerato il sierotipo prevalente nei casi di streptococcosi suina e umana in tutto il mondo (Estrada et al., 2019). Nel corso degli ultimi 20 anni tuttavia, si è assistito ad un progressivo aumento dei casi sostenuti da *S. suis* sierotipo 9 (SS9), sia in Europa che in Cina (Zheng et al., 2018). Inoltre nel 2015 in Thailandia è stato segnalato il primo caso di infezione umana legata a SS9 (Willems et al., 2019). In uno studio recente abbiamo descritto un incremento delle infezioni da SS9 negli allevamenti suini in Italia (Cucco et al., 2022). Un elevato numero di isolati SS9 italiani apparteneva ad un *sequence type* (ST) 123, precedentemente segnalato in Spagna nel 2009 (Blume et al., 2009). Inoltre, gli isolati italiani erano caratterizzati da una ridotta sensibilità alla penicillina e questa ridotta sensibilità caratterizzava in particolare ST123. La limitata efficacia dei vaccini disponibili per *S. suis* rende gli antibiotici uno strumento chiave per il trattamento, la prevenzione e il controllo delle infezioni sostenute da *S. suis* (Hadjirin et al., 2021). I beta-lattamici rappresentano la classe di prima linea per la terapia della streptococcosi. Il bersaglio dei beta-lattamici è costituito dalle proteine leganti la penicillina (*Penicillin Binding Protein*, PBP), coinvolte nella biosintesi della parete cellulare batterica. Questi antibiotici si legano covalentemente ai tre siti attivi dei domini attivi delle PBP, SXXX, (S/Y)XN e (K/H)(D/T)G, e impediscono il legame con i peptidi, una fase cruciale nella sintesi del peptidoglicano. Il fenomeno della resistenza ai beta-lattamici è stato ampiamente studiato in *S. pneumoniae*: in questa specie, il meccanismo di resistenza è legato ad una ridotta affinità delle PBP per questi antibiotici. A livello delle PBP, la ridotta affinità per i beta-lattamici è legata a molteplici sostituzioni degli aminoacidi nei siti attivi delle sequenze (Zapun et al., 2008). Meno informazioni sono disponibili per altre specie del genere. Tuttavia, dopo la segnalazione di ceppi penicillino-resistenti in *S. suis*, l'interesse per la resistenza ai beta-lattamici in questa specie è aumentato. Negli ultimi due anni, Bamphensin ha descritto le mutazioni delle PBPs in *S. suis* penicillino-resistente isolato dall'uomo in Thailandia (Bamphensin et al., 2021), mentre Hadjirin (Hadjirin et al., 2021) ha esplorato gli effetti delle mutazioni della sequenza delle PBP sulla sensibilità ai beta-lattamici in *S. suis*. L'ipotesi alla base di questo studio è che una ridotta sensibilità ai beta-lattamici sia emersa in alcuni cloni SS9 di *S. suis* e abbia contribuito al successo della loro diffusione, come possibile conseguenza dell'uso di beta-lattamici negli allevamenti suini italiani. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare l'andamento della sensibilità ai beta-lattamici della popolazione di SS9 *S. suis* proveniente da suini malati in Italia negli ultimi venti anni, correlandolo all'appartenenza ai diversi ST e alle sostituzioni a carico delle PBP.

## MATERIALI E METODI

### Test microbiologici

66 isolati raccolti da suini con infezione clinica da *S. suis* in allevamenti dell'Italia centro-settentrionale durante il periodo 2002-2021, appartenenti al SS9 sono stati inclusi in questo lavoro. Una parte di questi isolati era stata analizzata in un nostro precedente studio (Cucco et al., 2022). Il criterio applicato per evitare ridondanze è stato includere solo 1 isolato per anno e per azienda di *S. suis*. I campioni sono stati seminati su Agar Sangue (5% globuli rossi di montone), incubati a 37°C in atmosfera arricchita con 5% CO<sub>2</sub>, e identificati mediante MALDI-TOF (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). Tutti gli isolati sono stati testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici mediante il metodo della diluizione in brodo, usando un pannello commerciale 96-wellmicrotitre MIC (BOP06F, Sensititre; Trek Diagnostic Systems Inc., England) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 è stato usato come ceppo di controllo. I valori di MIC sono stati interpretati utilizzando i breakpoint raccomandati dal Clinical Laboratory Standard Institute per *S. suis* (CLSI VET 01-ed.5, 2020). In assenza di breakpoint specifici per *S. suis*, per trimetoprim/sulfametossazolo e clindamicina si sono applicati i criteri interpretativi per *S. pneumoniae*.

### Analisi genomica

Il DNA genomico dei 66 isolati di *S. suis* è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) per poi essere sottoposto a sequenziamento utilizzando la piattaforma Illumina NextSeq 500. Dopo le fasi di *trimming* e valutazione di qualità, le sequenze sono state assemblate usando SPAdes genome assembler v3.11.1 (Prjibelski et al., 2014) e annotate usando Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014). I prodotti generati da Prokka sono stati analizzati con Roary v3.11.3 (Page et al., 2015) per ottenere un allineamento del core genome utilizzato per creare un albero filogenetico di massima verosimiglianza con FastTree 2.1.11 (Price et al., 2010). Dal database Sequence Read Archive (SRA) sono state scaricate le sequenze dei genomi di *S. suis* SS9 tra quelle disponibili in letteratura, per essere confrontate tramite l'albero filogenetico con le sequenze dei nostri genomi SS9.

Le sequenze dei 66 ceppi di *S. suis* sono state utilizzate per identificare il ST utilizzando *S. suis* MLST database (<https://pubmlst.org/ssuis/>), il profilo di virulenza mediante la ricerca dei geni di virulenza utilizzando BLASTN v2.13.0 (Camacho et al., 2009) e i geni resistenti agli antimicrobici che sono stati analizzati con ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>).

La resistenza ai beta-lattamici è stata studiata analizzando le mutazioni all'interno delle PBP (PBP1A, PBP1B, PBP2A, PBP2B e PBP2X). Le sequenze delle PBP dei 66 isolati sono state allineate manualmente con MUSCLE online (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) utilizzando *Streptococcus suis* BM407 (GenBank GCA\_000026745.1) come riferimento.

### Analisi statistica

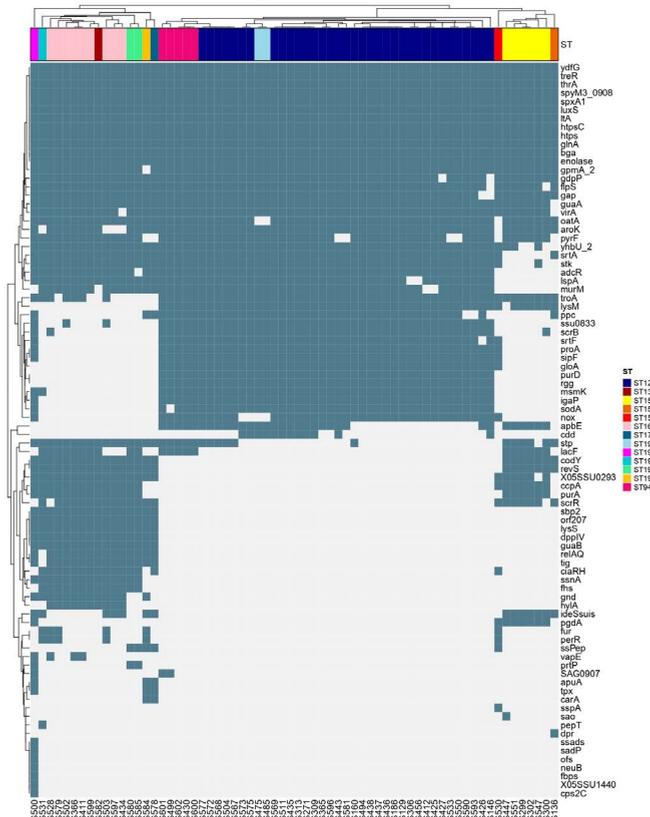
L'associazione tra i valori di MIC, l'anno di isolamento e il ST di appartenenza è stata studiata utilizzando la funzione `lm` di R software (v 4.1.3). In particolare, tutti gli ST che presentavano meno di due isolati sono stati accorpato in un'unica categoria e l'associazione tra ciascun ST e l'esito di MIC è stata valutata considerando l'appartenenza a ST16 come baseline. I valori di MIC sono stati trasformati in log e sono stati costruiti tre modelli utilizzando penicillina, ceftiofur e ampicillina come variabili dipendenti.

Per quanto riguarda la correlazione tra le sostituzioni delle PPB e la resistenza ai beta-lattamici, questa è stata indagata attraverso un processo in più fasi. Innanzitutto, la distribuzione delle diverse sostituzioni negli isolati è stata esplorata mediante heatmap utilizzando R software (Figura 2). Quindi, la associazione di più sostituzioni in un unico blocco è stata confermata mediante analisi tetracorica in R, accorpando tutte le sostituzioni con un indice uguale o superiore a 0.8. Infine, utilizzando la funzione di regressione lineare (`lm`) di R è stata testata la associazione tra i blocchi

di sostituzioni di PBP e i valori di MIC per penicillina, ampicillina e ceftiofur, trasformati in log. Per quanto riguarda i geni di virulenza, abbiamo preso in considerazione il numero totale di geni rilevati in ciascun isolato e abbiamo valutato le differenze fra isolati appartenenti a ST differenti. In particolare, dopo aver controllato la normalità dei dati utilizzando il test di normalità di Shapiro-Wilk, abbiamo eseguito il Kruskal-Wallis rank sum test, e conseguentemente il post hoc test di Dunn per confronti multipli. Abbiamo poi creato una heatmap che rappresentasse per ciascun isolato la presenza/assenza dei geni di virulenza utilizzando R software. Per tutte le analisi, è stato applicato un limite di significatività pari a  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

Sono stati identificati tredici diversi ST: ST123, ST136, ST1540, ST1541, ST1546, ST16, ST17, ST1953, ST1954, ST1955, ST1956, ST1957 e ST94. ST123 e ST16 sono stati gli ST più diffusi, rappresentando rispettivamente il 53% ( $n = 35$ ) e il 13,6% ( $n = 9$ ) dei nostri isolati. Cinque nuovi ST sono stati identificati come ST1953-ST1957 (ID3308-ID3314; <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>). Sono 86 i geni di virulenza rilevati in almeno un isolato. La presenza/assenza di questi geni in ciascuno dei 66 isolati classificati rispetto al ST di appartenenza è stata rappresentata tramite una heatmap nella Figura 1, che evidenzia come gli SP si differenzino tra di loro rispetto alla distribuzione dei geni di virulenza sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo.



**Figura 1.** Heatmap che mostra la distribuzione dei geni di virulenza nei 66 isolati di *S. suis*. Il blu rappresenta la presenza e il bianco l'assenza di un gene di virulenza.  
**Figure 1.** Heatmap demonstrating the distribution of virulence genes in the 66 *S. suis* isolates. Blue represents the presence and white represents the absence of a virulence gene.

Il test di Kruskal-Wallis, effettuato sul numero totale di geni di virulenza rilevati in ciascun isolato, ha dimostrato in generale una differenza significativa tra gli isolati appartenenti a ST differenti ( $p < 0.001$ ). In particolare, il numero di geni di virulenza degli isolati ST123 differiva da quello degli isolati ST16; tale differenza è stata riscontrata anche tra ST1540 e ST16 e tra ST1540 e ST94 ( $p < 0,05$ ; Dunn test). Un blocco di 18 geni di virulenza risultava caratteristico degli isolati ST123 e ST94. Altri cluster di geni di virulenza risultavano evidenti nella heatmap e riguardavano gli ST16 e gli ST1540.

La Tabella 1 mostra la distribuzione dei 66 isolati di *S. suis* sulla base dei valori di MIC nei confronti di 8 molecole antibiotiche. Tutti gli isolati erano sensibili ad ampicillina e a ceftiofur, mentre il 36,4% ( $n=24$ ) erano resistenti alla penicillina. Un numero elevato di isolati era resistente alla clindamicina ( $n=52$ , 85,2%) e tutti gli isolati erano resistenti a tetraciclina ( $n=66$ ). Bassi livelli di resistenza sono stati osservati per sulfametossazolo/trimetoprim ( $n=5$ , 7,6%), florfenicolo ( $n=1$ , 1,5%) ed enrofloxacin ( $n=1$ , 1,5%).

È importante sottolineare come la ridotta sensibilità alla penicillina si sia osservata in modo diverso nei ST, e in particolare come in ST16 la sensibilità si mantenga al di sotto di 0,12 µg/ml, mentre 32/35 isolati appartenenti a ST123 si caratterizzavano per valori di MIC > 0,12 µg/ml (Figura 2). *TetO* e *ermB* sono stati i principali geni di antibiotico-resistenza descritti negli isolati. Altri geni sono stati *aph(3')* ( $n=6$ ), *fexA* ( $n=1$ ), *optrA* ( $n=3$ ), *lnuB* ( $n=5$ ) e *spc* ( $n=5$ ).

**Tabella 1.** Distribuzione dei valori di MIC tra i 66 isolati di *S. suis*. Tra parentesi sono indicate le percentuali. L'area in grigio rappresenta il range di concentrazioni testate per ciascun antibiotico. Le linee verticali indicano la soglia per la resistenza secondo quanto indicato dal CLSI.

**Table 1.** Distribution of MIC values among the 66 *S. suis* isolates. Percentages are shown in brackets. Shaded areas show the range of values actually tested for each antibiotic. Vertical bars indicate the threshold values for clinical resistance, according to CLSI.

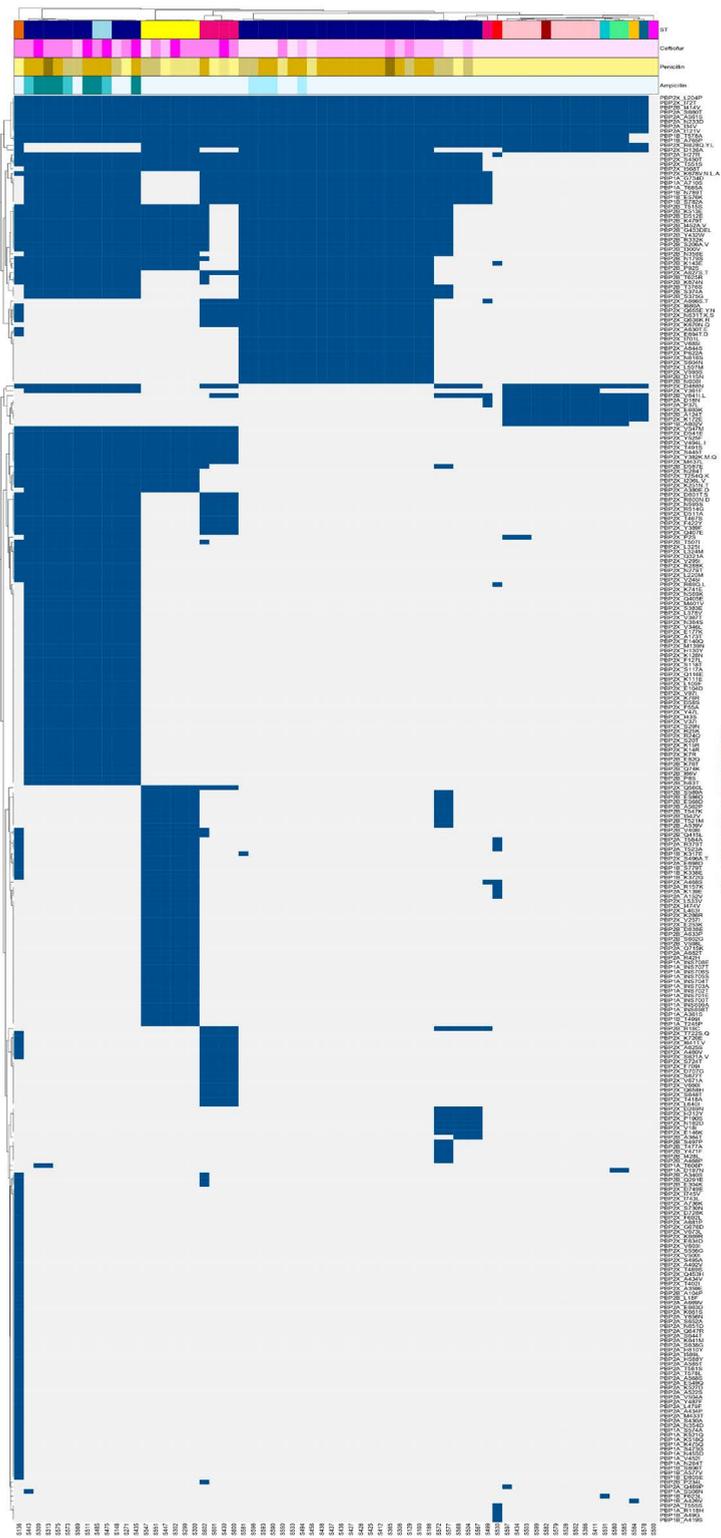
Antibiotici	Valori di MIC µg/ml												
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Ceftiofur		28 (42.4%)	16 (24.3%)	16 (24.3%)	6 (9%)								
Penicillina G	25 (37.9%)	6 (9%)	11 (16.7%)	22 (33.4%)	2 (3%)								
Ampicillina		57 (87.4%)	3 (4.6%)	6 (9%)									
Enrofloxacin		1 (1.5%)	18 (27.3%)	46 (69.7%)	1 (1.5%)								
Tetraciclina				1 (1.5%)	1 (1.5%)			64 (97%)					
Florfenicolo			2 (3%)	46 (69.7%)	17 (25.8%)		1 (1.5%)						
SXT*			61 (92.4%)			5 (7.6%)							
Clindamicina		9 (14.8%)		1 (1.6%)					51 (83.6%)				
Tilosina			9 (14.8%)								52 (85.2%)		
Neomicina						31 (50.8%)	13 (21.3%)	7 (11.5%)	5 (8.2%)	5 (8.2%)			
Gentamicina				6 (9.8%)	40 (65.6%)	6 (9.8%)	1 (1.7%)	2 (3.3%)	6 (9.8%)				
SDM**											16 (26.2%)		45 (73.8%)

\* SXT: Sulfametossazolo+Trimetoprim\*\* SDM: Sulfadimetossina

Il numero totale di mutazioni a livello delle PBP varia da 0, osservato in un isolato di cinghiale, a 152, riscontrate in un isolato ST1541 isolato nel 2017. Il maggior numero di sostituzioni è stato riscontrato nella sequenza PBP2X, con un massimo di 77 sostituzioni per isolato, mentre 31 è stato il numero massimo di sostituzioni in PBP2B riscontrato in un singolo isolato. Le altre tre PBP hanno mostrato un numero massimo di sostituzioni pari a 7 (PBP1B), 13 (PBP1A) e 37 (PBP2A). Come mostrato nella Figura 2, è interessante notare come la distribuzione delle sostituzioni tra gli isolati di *S. suis* non sia casuale. Gli isolati infatti, clusterizzano in base alle sostituzioni, rivelando un'architettura a mosaico delle PBP. Come mostra la Figura 3, i valori di MIC (log) per la penicillina hanno avuto un andamento tendenzialmente crescente dal 2002 al 2021. Tale tendenza è stata confermata dall'analisi di regressione multipla ( $R^2$  aggiustato=0,661) che ha evidenziato da un lato un'associazione positiva tra i valori di MIC (log) per la penicillina e l'anno di isolamento ( $p=0,0018$ ; coeff. 0,018 IC95%=0,007-0,029), e dall'altro come l'appartenenza a ST123, ST1540 e ST1953 sia risultata associata a più alti livelli di MIC (log) rispetto a quelli relativi ad ST16 (ST123:  $p<0,001$ , coeff. 0,718 IC95%=0,534-0,903; ST1540:  $p=0,037$ , coeff. 0,281 IC95%=0,017-0,544; ST1953:  $p<0,001$ , coeff. 0,824 IC95%=0,436-1,211). In particolare, il modello evidenzia un incremento annuo del valore di MIC per penicillina di circa il 4%. Mentre l'appartenenza a ST123 è associata a valori di MIC per penicillina 5,2 volte superiori a quelli osservati per ST16; 1,9 volte nel caso di ST1540 e 6,7 volte nel caso di ST1953.

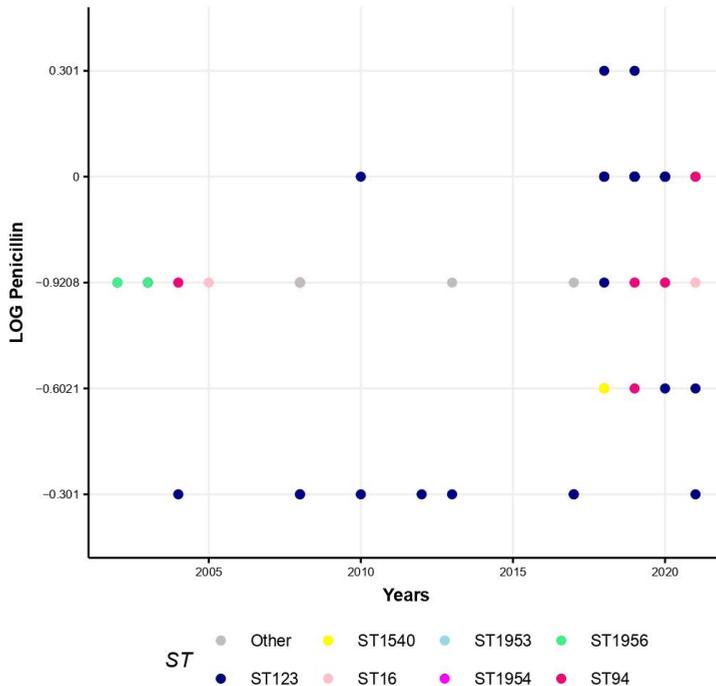
**Figura 2.** *Heatmap* che mostra la distribuzione delle sostituzioni a livello delle PBP nei 66 isolati di *S. suis*. Il colore blu rappresenta la presenza e il bianco l'assenza di ciascuna sostituzione.

**Figure 2.** Heatmap demonstrating the distribution of PBP substitutions in the 66 *S. suis* isolates. Blue and white represents the presence and the absence of a specific substitution, respectively.



**Figura 3.** Distribuzione dei valori di MIC trasformati in log nei diversi anni di isolamento. Ogni punto rappresenta un isolato ed il colore appartenenza al ST.

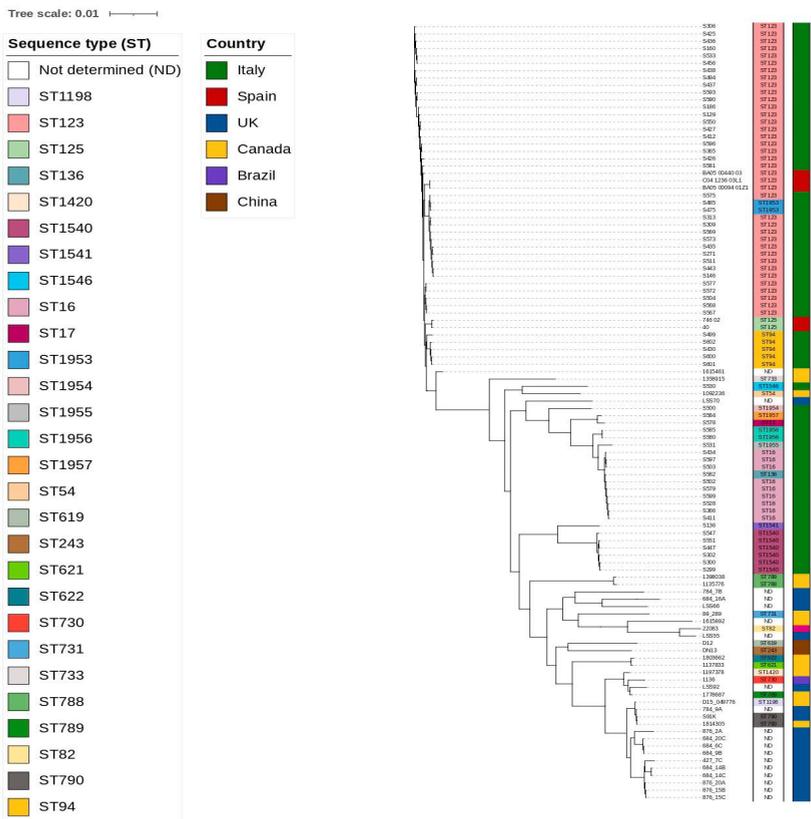
**Figure 3.** Distribution of the MIC values log-transformed among the years of isolation. Dots are coloured according to ST.



Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, come mostrato in Figura 4, i 106 isolati SS9 si distribuiscono in 5 distinti cluster. Il cluster più grande (*phylogenetic cluster 1*) è costituito da 42 isolati italiani appartenenti a ST123, ST1953 e ST94 e da 5 ceppi spagnoli appartenenti a ST123 e ST125. Un ceppo canadese (ST54) e uno italiano ST1546 sono raggruppati in un secondo *cluster*. Gli isolati di *S. suis* italiani appartenenti a ST16 e un ST136 si trovavano nel terzo *phylogenetic cluster*, mentre gli isolati ST1540 appartengono al quarto *cluster*. Il quinto *cluster* è composto dai restanti 31 isolati provenienti da 4 Paesi diversi (Regno Unito, Brasile, Canada e Cina).

**Figura 4.** Albero filogenetico annotato utilizzando iTOL (<https://itol.embl.de/>). L'albero contiene i 106 isolati di *S. suis* SS9 analizzati nel presente studio. I *sequence type* (ST) e la provenienza geografica di ciascun isolato sono rappresentati nell'albero.

**Figure 4.** Phylogenetic tree annotated using iTOL (<https://itol.embl.de/>). The tree contains the 106 isolates of *S. suis* SS9 analyzed in the present study. The sequence types (ST) and geographic origin of each isolate are represented in the tree.



## DISCUSSIONE

Questo lavoro ci ha permesso di caratterizzare *S. suis* sierotipo 9 circolanti in Italia dal 2002 in termini di ST e sensibilità agli antimicrobici e di approfondire in particolare la resistenza ai beta-lattamici mediante lo studio delle mutazioni a livello delle PBP.

Tra gli SS9 isolati da suini in corso di streptococcosi in Italia, il ST123 è stato il più frequentemente riscontrato, seguito dal ST16. Entrambi gli ST sono già stati segnalati in suini in Europa: il ST123 in Spagna (Blume et al., 2009) e il ST16 in Olanda (Willemse et al., 2016). Il ST16 è considerato un ST emergente grazie alle sue caratteristiche di patogenicità e al suo potenziale zoonotico (Willemse et al., 2019). Nel nostro lavoro, ST16 e ST123 erano nettamente distinti sia in termini di fattori di patogenicità, sia come sensibilità ai beta lattamici. Tra gli ST123 analizzati nel presente lavoro, la maggior parte è risultata resistente alla penicillina, mentre gli isolati afferenti a ST16 erano completamente sensibili ai beta-lattamici. Gli ST123 erano inoltre caratterizzati da valori di MIC più elevati per gli altri beta-lattamici, ceftiofur e ampicillina, nonostante questa ridotta sensibilità non abbia raggiunto

i livelli di resistenza clinica. Tuttavia, la ridotta sensibilità ai beta-lattamici non era ristretta a ST123, ma coinvolgeva altri ST, tra cui ST1953, che differiva da ST123 per un singolo allele, e ST1540. Gli isolati ST123, ST1953 e ST94 di origine italiana erano collocati all'interno dello stesso *phylogenetic cluster* dei ceppi ST123 e ST125 di origine spagnola e, a differenza degli isolati appartenenti a ST16, si distinguevano nettamente da altri ceppi di SS9 isolati in Cina, Regno Unito o Canada.

Da un punto di vista temporale, è stata riscontrata un'associazione tra una ridotta sensibilità a penicillina e l'anno di isolamento. La sensibilità a penicillina è infatti diminuita significativamente dal 2004 al 2021 ed è risultata fortemente associata a ST123, ST1953 e ST1540.

Anche all'interno di ST123 tuttavia, la sensibilità ai beta lattamici non era omogenea. Infatti sono stati osservati isolati ST123 caratterizzati da una piena sensibilità ai beta-lattamici accanto ad isolati clinicamente resistenti. Gli isolati ST123 clinicamente resistenti a penicillina provenivano esclusivamente da casi osservati a partire dal 2017. Anche per ceftiofur valori di MIC superiori a 1µg/ml sono stati osservati solo dopo il 2017. Questi risultati confermano che la sensibilità ai beta-lattamici si è progressivamente ridotta negli ultimi vent'anni.

Le sostituzioni osservate nelle sequenze di PBP non erano indipendenti l'una dall'altra, ma associate in grandi blocchi, con una caratteristica struttura a mosaico (Zapun et al., 2008). La sequenza amminoacidica nelle PBP mosaico poteva infatti differire dalla sequenza non a mosaico fino al 10% (osservata in PBP2X). È interessante notare che alcune sostituzioni che abbiamo trovato associate negli stessi blocchi sono state rilevate insieme anche da Bamphesin (2021), che le ha descritte in isolati di *S. suis* di origine umana, appartenenti ai sierotipi 2, 14 e 24 (Bamphesin et al., 2021). Alcune di queste sostituzioni, come la T551S a carico di PBP2X, sono già state inoltre descritte da Hadjirin (2021) in associazione ad una riduzione della sensibilità ai beta-lattamici e trovano riscontro in altre specie di *Streptococcus* spp.

In *S. pneumoniae*, l'origine delle sequenze codificanti PBP con bassa affinità per i beta-lattamici è stata fatta risalire a specie commensali appartenenti allo stesso genere, *Streptococcus mitis* o *Streptococcus oralis*: le sequenze mosaico sono state poi acquisite da *S. pneumoniae* probabilmente tramite trasformazione (Zapun et al., 2008); (Chagneau et al., 2022). La presenza di grandi blocchi di mutazioni nei nostri isolati suggerisce che un fenomeno simile potrebbe essersi verificato in *S. suis*, probabilmente favorito dalla pressione selettiva generata dall'uso di beta-lattamici nei suini.

## CONCLUSIONI

L'espansione dei cloni di *S. suis* caratterizzati da una bassa sensibilità ai beta lattamici sta portando ad una progressiva diminuzione di efficacia a questi antibiotici, un evento già verificatosi per *S. pneumoniae*. Questo evento è particolarmente indesiderato in un batterio con limitati strumenti di controllo negli allevamenti e caratterizzato da potenzialità zoonosiche. L'impiego dei beta-lattamici degli allevamenti deve essere il più possibile limitato, ed è necessario attivare un sistema per il monitoraggio continuo di questo fenomeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bamphesin, N., Chopjitt, P., Hatrongjit, R., Boueroy, P., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., & Kerdsin, A. (2021). Non-penicillin-susceptible streptococcus suis isolated from humans. *Pathogens*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens10091178>
2. Blume, V., Luque, I., Vela, A. I., Borge, C., Maldonado, A., Domínguez, L., Tarradas, C., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2009). Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *International Microbiology*, 12(3), 161–166. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.94>
3. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*,

10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
4. Chagneau, C. v., Alcouffe, O., Grare, M., Oswald, E., & Massip, C. (2022). Screening for  $\beta$ -lactam resistance by penicillin G in the *Streptococcus anginosus* group challenged by rare strains with altered PBPs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(7), 1847–1850. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac139>
  5. Cucco, L., Panicià, M., Massacci, F. R., Morelli, A., Ancora, M., Mangone, I., di Pasquale, A., Luppi, A., Vio, D., Cammà, C., & Magistrali, C. F. (2022). New Sequence Types and Antimicrobial Drug-Resistant Strains of *Streptococcus suis* in Diseased Pigs, Italy, 2017-2019. *Emerging Infectious Diseases*, 28(1), 139–147. <https://doi.org/10.3201/eid2801.210816>
  6. Estrada, A. A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., & Marthaler, D. G. (2019). Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(9), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JCM.00377-19>
  7. Hadjirin, N. F., Miller, E. L., Murray, G. G. R., Yen, P. L. K., Phuc, H. D., Wileman, T. M., Hernandez-Garcia, J., Williamson, S. M., Parkhill, J., Maskell, D. J., Zhou, R., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Tucker, A. W. (Dan), Hoa, N. T., Welch, J. J., & Weinert, L. A. (2021). Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *BMC Biology*, 19(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01094-1>
  8. Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
  9. Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
  10. Prjibelski, A. D., Vasilinetc, I., Bankevich, A., Gurevich, A., Krivosheeva, T., Nurk, S., Pham, S., Korobeynikov, A., Lapidus, A., & Pevzner, P. A. (2014). ExSPAnDer: A universal repeat resolver for DNA fragment assembly. *Bioinformatics*, 30(12), 293–301. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu266>
  11. Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
  12. Willemse, N., Howell, K. J., Weinert, L. A., Heuvelink, A., Pannekoek, Y., Wagenaar, J. A., Smith, H. E., van der Ende, A., & Schultsz, C. (2016). An emerging zoonotic clone in the Netherlands provides clues to virulence and zoonotic potential of *Streptococcus suis*. *Scientific Reports*, 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28984>
  13. Willemse, N., van der Ark, K. C. H., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H., Picavet, D. I., van Solt-Smits, C., Wisselink, H. J., Schultsz, C., & de Greeff, A. (2019). Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0>
  14. Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 361–385. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>
  15. Zheng, H., Du, P., Qiu, X., Kerdsin, A., Roy, D., Bai, X., Xu, J., Vela, A. I., & Gottschalk, M. (2018). Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. *Veterinary Research*, 49(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0498-2>