

**PERSISTENZA DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO
RESISTENTI NEGLI AMBIENTI DI ALLEVAMENTO DOPO
PULIZIA E SANIFICAZIONE E SULLE CARCASSE SUINE A FINE
MACELLAZIONE**

***PERSISTENCE OF METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS
AUREUS IN PIG HOLDINGS AFTER CLEANING AND
SANITIZATION AND ON PIG CARCASSES AT THE END OF THE
SLAUGHTERING PROCESS***

GALLETTI E.¹, MERIALDI G.¹, ROSIGNOLI C.¹, MAZZARO A.¹, ALBORALI
G.¹, GRASSI A.¹, ZANONI MG., GRANITO G.², GUERZONI S.², ARIOLI E.²,
ZAVATTINI S.², FRANCO A.³, BONILAURI P.¹, MARTELLI P.⁴

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

² Veterinari liberi professionisti

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

⁴ Dipartimento di Salute Animale - Università degli Studi di Parma

Parole chiave: MRSA, suini, antibiotico resistenza, zoonosi

Key words: MRSA, pigs, antimicrobial resistance, zoonoses

Riassunto. Questo lavoro si è prefisso due scopi: 1) valutare la persistenza di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) negli ambienti di allevamenti suini naturalmente contaminati dopo l'applicazione delle operazioni di pulizia e sanificazione; 2) valutare la persistenza della contaminazione da MRSA sulle carcasse di suini, provenienti da allevamenti positivi, alla fine del processo di macellazione. Sei allevamenti già identificati come positivi per MRSA sono stati inclusi nello studio. Da ciascun allevamento sono stati raccolti campioni ambientali dalle sale parto, svezzamento, messa a terra e ingrasso prima (in presenza di suini, alla fine della fase) e dopo le procedure di pulizia e disinfezione (prima dell'introduzione dei suini). Per la valutazione della presenza di MRSA sulle carcasse suine alla fine della macellazione sono state studiate tre partite di suini provenienti da altrettanti allevamenti dei sei precedenti. Da ciascuna partita 60 tamponi nasali sono stati raccolti dopo iugulazione e 20 tamponi (sodibox®) sono stati attenuti dallo strofinamento della cute della gola alla fine della catena di macellazione. I risultati ottenuti confermano l'elevata contaminazione ambientale da parte di MRSA negli allevamenti studiati. Le operazioni di sanificazione non si sono dimostrate sempre idonee ad eliminare completamente la contaminazione ambientale, tuttavia, in tutte le fasi di produzione, è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra gli ambienti prima e dopo le operazioni di lavaggio e disinfezione. Tale differenza è apparsa molto più evidente nelle sale parto. Lo studio condotto al macello ha fornito evidenza della contaminazione da MRSA delle carcasse provenienti da allevamenti naturalmente colonizzati.

Abstract. This study was conducted to evaluate: 1) the persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) after cleaning and sanitization operations in the environment of pig herds previously known to be colonized; 2) the presence of MRSA on pig carcasses at the end of the slaughter process. Six herds colonized by MRSA were enrolled. From each herd, environmental samples were collected from farrowing, weaning, growing and finishing units. Ten dust samples for each unit were taken by using sterile dry swabs (Sodibox®) before (in the presence of pigs, at the end of the phase) and after cleaning and sanitization procedures (before

pigs introduction) and cultured for MRSA. The evaluation of the presence of MRSA on pig carcasses at the end of the slaughtering chain was conducted on three batches from different herds. From each batch 60 nasal swabs were collected immediately after jugulation and twenty samples were gathered using sterile dry swabs (Sodibox®) from the skin of the throat region at the end of the slaughter line, just before cutting or chilling. In populated farrowing crates 5 of 6 herds were contaminated (percentage of positive dust samples ranging from 30% to 100%). Only one herd showed residual MRSA contamination in farrowing crates after cleaning and sanitization (1 positive out of 10). Environmental contamination in populated weaning units was recorded in 5 out of 6 holdings (range 20%-100%); 3 holdings resulted contaminated after cleaning and sanitization (range 30%-100%). In growing units all herds were contaminated while populated (range 20%-90%) and 5 after cleaning and sanitization (20%-70%). Populated finishing barns resulted contaminated in all holdings (range 10-90%). The environmental contamination persisted after cleaning in 4 out of 6 (range 10%-20%). The overall proportion of positive samples in populated units and after cleaning and sanitization were 50 and 19%, respectively.

The study suggests that, although current cleaning and sanitization procedures are likely to be inadequate to completely eliminate MRSA environmental contamination, the more these operations are strict (as in farrowing crates) the more a significant reduction can be achieved.

INTRODUZIONE

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) è un batterio Gram-positivo considerato come resistente a tutti gli antibiotici beta-lattamici. I ceppi di MRSA sono emersi a livello ospedaliero negli anni '70. Dagli anni '90 è stato osservato un sostanziale cambiamento nell'epidemiologia di MRSA, con la diffusione di ceppi multiresistenti anche in soggetti non ospedalizzati, definiti come Community-acquired MRSA (CA-MRSA).

La prima segnalazione di colonizzazione nei suini con implicazione nelle infezioni umane è stata riportata da Voss et al., (2005) nei Paesi Bassi; successivamente, vi sono state segnalazioni anche in Francia, Danimarca, Germania e Singapore (Guardabassi et al., 2007; de Neeling et al., 2007; Sergio et al., 2007) e il contatto con i suini è stato identificato come importante fattore di rischio per la colonizzazione di MRSA nell'uomo (Rijen et al., 2007). Studi recenti hanno inoltre documentato la trasmissione di MRSA tra suini e operatori del settore suinicolo come veterinari, operai e loro famiglie (Voss et al., 2005; Huijsdens et al., 2006; Pan et al., 2009). In Italia, in un recente studio, nel 38% delle partite di suini macellati è stata evidenziata colonizzazione nasale da MRSA con notevole eterogeneità dei cloni isolati (Battisti et al., 2010).

Il potenziale ruolo dei prodotti alimentari nella diffusione di MRSA di origine animale è tuttora sconosciuto; alcuni lavori hanno comunque messo in evidenza la presenza di MRSA nella catena alimentare (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007). Secondo il parere dell'EFSA, pur essendo basso il rischio di infezione per l'uomo tramite il cibo, assumere o maneggiare cibi contaminati può rappresentare veicolo di trasmissione di MRSA (The EFSA Journal, 2009). Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare la persistenza di MRSA in allevamenti suini della Lombardia e dell'Emilia Romagna, valutando nello specifico la contaminazione ambientale nelle diverse fasi dell'allevamento prima e dopo pulizia e disinfezione e la presenza sulle carcasse dei suini al termine della catena di macellazione.

MATERIALI E METODI

Studio in allevamento:

Gli allevamenti sono stati arruolati in base ad un'analisi preliminare che aveva evidenziato la colonizzazione di tali allevamenti per MRSA. In totale sono stati considerati 6 allevamenti, due

della provincia di Modena, 2 della provincia di Mantova, 1 della provincia di Verona e 1 della provincia di Brescia.

Allevamento 1:

Allevamento di 1000 scrofe, dislocato in tre siti. Tutto pieno/tutto vuoto eseguito in ogni fase. Le fasi di sanificazione possono essere così riassunte: rimozioni parti asportabili (ove presenti), asportazione della componente organica, distribuzione del detergente schiumogeno e lavaggio con idropulitrice ad alta pressione. Ad ambiente asciutto segue quindi la distribuzione del disinfettante a base di aldeide glutarica e sali quaternari di ammonio. Il vuoto sanitario è fissato in 7 giorni per ogni ambiente. Le sale parto e gli svezzamenti sono lavati a caldo, mentre la fase di ingrasso è lavata a freddo.

Allevamento 2:

Allevamento di 900 scrofe, dislocato in tre siti. Viene effettuato il tutto pieno e tutto vuoto nelle sale parto e svezzamento (48 ore di vuoto sanitario). Nella fase di magronaggio-ingrasso il tutto pieno e tutto vuoto avviene per settore (5 gg di vuoto sanitario). La sanificazione nelle sale parto si attua mediante lavaggio a freddo a bassa pressione seguito dalla distribuzione di detergente alcalino schiumogeno; dopo 30 minuti si procede con lavaggio ad alta pressione a caldo, risciacquo con acqua fredda, asciugatura e disinfezione con un prodotto a base di alchilammine. Negli svezzamenti il protocollo prevede la fase di lavaggio ad alta pressione a freddo e non a caldo, per il resto la procedura è simile a quella utilizzata nelle sale-parto. Nell'ingrasso viene utilizzata l'acqua fredda ad alta pressione, a cui segue, dopo opportuna asciugatura, la disinfezione con un prodotto a base di alchilammine.

Allevamento 3:

Allevamento di 2000 scrofe, dislocato in due siti. Viene effettuato il tutto pieno-tutto vuoto in tutti i settori (vuoto sanitario variabile da 1 a 3 giorni). Le procedure di sanificazione nelle sale parto prevedono: lavaggio a bassa pressione degli ambienti, l'applicazione del detergente schiumogeno, l'attesa di 10 minuti, il lavaggio ad alta pressione a freddo, la disinfezione con prodotto a base di glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio e l'applicazione di calce idrata. Negli svezzamenti, magronaggi e ingrassi, a differenza del protocollo in uso per le sale-parto, non è prevista la fase di detersione con schiumogeno. Inoltre, la calce idrata non viene utilizzata negli svezzamenti e nei magronaggi ma solo nelle strutture per l'ingrasso.

Allevamento 4:

Allevamento di 1000 scrofe, in sito unico. Nell'allevamento viene effettuato il tutto pieno e tutto vuoto nelle sale parto e svezzamento. Nella fase di messa a terra il flusso è continuo, mentre nell'ingrasso il tutto pieno e tutto vuoto avviene per settore. I protocolli di pulizia e disinfezione prevedono un lavaggio con vapore a caldo, l'uso di un detergente schiumogeno alcalino e di un disinfettante a base di alchilammine e sali quaternari di ammonio ed EDTA.

Allevamento 5:

Allevamento di 1500 scrofe, dislocato in due siti. Nell'allevamento viene effettuato il tutto pieno e tutto vuoto nelle sale parto, svezzamento e messa a terra. Nella fase di dell'ingrasso il tutto pieno e tutto vuoto avviene per settore. I protocolli di pulizia e disinfezione prevedono un lavaggio con vapore a caldo, l'uso di un detergente schiumogeno alcalino e di un disinfettante a base di aldeide glutarica e sali quaternari di ammonio.

Allevamento 6:

Allevamento di circa 1550 scrofe dislocato in due siti. Tutto pieno/tutto vuoto eseguito in ogni fase. Nella sala parto viene distribuito un prodotto alcalino schiumogeno direttamente a contatto con strutture e sostanza organica. Segue lavaggio con idropulitrice (a caldo) dispersione di un disinfettante multicomposto (VIRKON S®).

Nelle gabbiette di svezzamento, nella messa a terra ed ingrasso, dopo l'allontanamento dei suini, la sala viene bagnata con acqua di riciclaggio per 24 ore. Segue lavaggio con idropulitrice (a caldo) dispersione di un disinfettante multicomposto (VIRKON S®).

All'interno di ciascun allevamento sono stati prelevati campioni da: sale parto, gabbie svezzamento, locali di messa a terra, locali di ingrasso. Le condizioni di prelievo scelte sono state; 1) presenza di animali al termine di ciascuna fase, 2) dopo pulizia e disinfezione in assenza di animali. I prelievi sono stati effettuati strofinando 10 garze sterili (Sodibox®) su superfici ambientali.

Studio al macello

La valutazione sulla presenza di MRSA sulle carcasse a fine macellazione è stata eseguita su 3 partite provenienti da 3 dei sei allevamenti predenti ed, in particolare, da 1 allevamento della provincia di Modena e dai due di Mantova. Da ogni partita sessanta tamponi nasali sono stati prelevati da suini immediatamente dopo la iugulazione al fine di confermare la colonizzazione da MRSA. Alla fine della catena di macellazione, appena prima del sezionamento a caldo, garze sterili (Sodibox®) sono state strofinate sulla cute della regione della gola per valutare la contaminazione delle carcasse.

Procedure di laboratorio

I tamponi nasali prelevati al macello sono stati raggruppati in 6 pool da 10 per ogni partita. Tutti gli altri campioni sono stati testati singolarmente.

Dopo una fase di pre-arricchimento del campione in Mueller-Hinton contenente 7,5% di NaCl, ed incubazione a 37°C per 24 ore, è stato eseguito un arricchimento in brodi selettivi costituiti da Phenol Red Mannitol Broth e Tryptone Soya Broth addizionati con 5 mg/L di oxacillina e 44 mg/L di aztreonam. Dopo incubazione a 37°C per 16-20 ore i brodi di arricchimento selettivo sono stati seminati su due terreni selettivi: Brilliance MRSA (Oxoid,UK) e Oxacillin Resistance Screen Agar (Oxoid,UK) e incubati a 37°C per 48 ore.

Le colonie sospette sono state quindi identificate come *S. aureus* tramite tecniche standard: morfologia della colonia, colorazione di Gram, test della catalasi e della coagulasi.

L'identificazione della specie tramite l'amplificazione del gene *nuc* e del gene codificante per la resistenza ai beta-lattamici *mecA* è stata inoltre effettuata tramite PCR secondo le metodiche descritte da Brakstad et al., (1992) e da Strommenger et al., (2003).

Tutti i ceppi isolati sono in corso di genotipizzazione.

Analisi Statistica

Le differenze fra le proporzioni di campioni risultati positivi per la presenza di *S. aureus* meticillino resistenti (MRSA) sia globalmente che nei differenti compartimenti degli allevamenti (sale parto, gabbie svezzamento, locali di messa a terra e di ingrasso) nelle due condizioni di prelievo (presenza di animali, indicate come piene e dopo pulizia e disinfezione indicate come vuote) sono state valutate tramite test χ^2 ($p < 0.01$). La probabilità di trovare un campione positivo nelle differenti condizioni di prelievo sia globalmente che per i differenti compartimenti degli allevamenti è stata misurata tramite calcolo dell'Odds ratio.

RISULTATI

Nelle sale parto in presenza di animali, gli allevamenti positivi sono risultati 5 con una percentuale di positività dei campioni all'interno di ciascun allevamento compresa fra 30% e 100%. I campioni ambientali raccolti dalle sale parto pulite e disinfettate hanno evidenziato la presenza di MRSA solo nell'allevamento 2 con una percentuale di campioni positivi pari al 10%. Cinque allevamenti hanno evidenziato MRSA nelle gabbie di svezzamento piene con percentuali di positività dal 20% (allevamento 5) al 100% (allevamento 2). Nella fase di svezzamento, 3 allevamenti su 6 hanno mostrato presenza di MRSA nelle gabbie pulite con percentuali di campioni positivi del 30% (allevamento 3), 40% (allevamento 6) e 100% (allevamento 2). Nella fase di messa a terra tutti gli allevamenti sono risultati positivi nei locali sporchi, con positività dal 20% al 90%. In

questa fase un solo allevamento è risultato negativo per MRSA nel campionamento dei locali puliti, nei restanti allevamenti le percentuali di positività variano dal 20% al 70%. Nell'ultima fase presa in considerazione, quella dell'ingrasso, tutti gli allevamenti sono risultati positivi nei locali pieni con una percentuale elevata solo nell'allevamento 2 (90%), mentre gli altri allevamenti hanno evidenziato positività variabili dal 10% al 30%. Due allevamenti sono risultati negativi nei locali puliti; le percentuali di positivi a questo livello sono pari al 10% e al 20%. Nel grafico 1 vengono riportati i dati di positività considerando tutti i campioni positivi dei sei allevamenti, con la separazione tra locali pieni (sporchi) e locali vuoti (puliti).

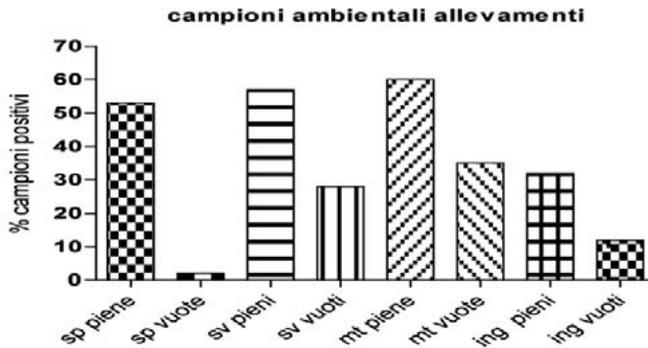


Grafico 1: percentuali di positività nei locali pieni e vuoti. **sp:** sala parto piena/vuota; **sv:** sala svezzamento piena/vuota; **mt:** locali messa a terra o pieni/vuoti; **ing:** locali ingrasso pieni/vuoti

Graph 1: percentage of positive samples of 6 herds in units with or without animals. **sp:** farrowing unit populated/empty; **sv:** weaning unit populated /empty; **mt:** growing unit populated /empty; **ing:** finishing units populated /empty

Globalmente la percentuale di campioni positivi è pari al 50,4% ed al 19%, rispettivamente prima e dopo le operazioni di pulizia e sanificazione. Questa differenza risulta statisticamente significativa ($p < 0.01$), inoltre la probabilità di osservare campioni positivi per MRSA in locali in presenza di animali è risultata essere 4.29 (IC 95%: 2.87 – 6.50) volte superiore.

Il risultato più interessante si ha tuttavia dall'analisi nei vari reparti. Infatti, la probabilità di osservare un campione contaminato da MRSA in sala parto è risultata essere ben 67.43 (IC 95%: 9.89- 2789.90, $p < 0.01$) volte superiore prima delle operazioni di pulizia e disinfezione. Nei restanti compartimenti questa probabilità risulta comunque significativamente maggiore, ma con odds ratio di molte unità inferiori. (tab.1)

Ambiente	Odds ratio $P_{(MRSA+)}$ piena / vuota	p
Sala Parto	67.43 (IC 95%: 9.89- 2789.90)	<0.01
gabbie svezzamento	3.31 (IC 95%: 1.45- 7.60)	<0.01
locali di messa a terra	2.78 (IC 95%: 1.25-6.25)	<0.01
locali di ingrasso	3.51 (IC 95%: 1.25-10.75)	<0.01

Tab.1. Odds ratio della probabilità di ottenere un campione positivo a seconda della presenza o dell'assenza degli animali e dello stato di pulizia degli ambienti.

Tab.1: Odds ratio of room with animal inside vs cleaned room for the probability of detection MRSA positive environmental samples.

Nelle fasi di produzioni in presenza di animali, gli allevamenti positivi sono pari a 5 nelle gabbie parto e svezzamento (percentuali di campioni positivi pari al 53% e 54% rispettivamente); nelle fasi successive tutti gli allevamenti sono positivi ma si osserva un picco della prevalenza dei Sodibox positivi nella fase di messa a terra (60%) e un decremento nella fase di ingrasso (32%).

Il numero di allevamenti positivi, dopo pulizia e disinfezione, è molto basso nelle sale parto (1 allevamento positivo su 6, con un solo sodibox positivo su 10) ed aumenta fino alla fase di messa a terra dove si raggiungono 5 allevamenti positivi su 6; nelle sale di ingrasso il numero di positivi decresce (4 su 6 allevamenti); le percentuali di campioni di positivi sono pari al 2%, 28%, 32% e 12% rispettivamente nelle quattro fasi.

Prendendo in considerazione i singoli allevamenti si è evidenziato come il solo allevamento 1 abbia sempre dato esito negativo per la ricerca di MRSA in tutte le fasi produttive dopo pulizia e disinfezione.

Per quanto riguarda i tamponi nasali raccolti dopo iugulazione, tutti i pool (6/6) sono risultati positivi nei primi due allevamenti mentre nell'allevamento 3 il 50% (3/6) dei pool è risultato positivo. I campioni eseguiti tramite strofinamento della cute alla fine della catena di macellazione hanno mostrato percentuali di positività pari al 20% (allevamento 1); 45% (allevamento 2); 40% (allevamento 3).

DISCUSSIONE

Per la valutazione della persistenza di *S. aureus* meticillino-resistenti a livello ambientale sono stati analizzati un totale di 480 sodibox di 6 diversi allevamenti, prelevati dalle gabbie parto, svezzamento, sale di messa a terra e ingrasso. In particolare sono stati analizzati 240 sodibox alla fine delle fasi di produzione (in presenza di animali) e 240 sodibox (dopo le fasi di pulizia e disinfezione).

Considerando il totale dei campioni è stata innanzi tutto evidenziata una sostanziale differenza, statisticamente significativa, tra i locali alla fine della fase di produzione (50,4%) rispetto agli stessi locali puliti e disinfettati (19%). Le procedure di pulizia e disinfezione risultano avere quindi un ruolo favorevole in termini di abbattimento della carica batterica ambientale e questo risulta evidente soprattutto nelle sale parto. In questo reparto, infatti, la probabilità che i campioni risultino positivi in presenza di animali è di ben 67 volte superiore rispetto alle sale vuote (pulite e disinfettate).

Campionando tamponi nasali di suini di diverse età, Smith et al.(2009) hanno mostrato positività per MRSA del 100% a 9-12 settimane, ed un decremento, fino al 36%, negli animali di età superiore alle 24 settimane. Weese et al., (2010a) analizzando sempre tamponi nasali di suinetti di 1 giorno di vita fino al 70° giorno di età hanno evidenziato una prevalenza totale nella fase di pre-svezzamento pari al 34.5% rispetto ad una prevalenza totale nel dopo svezzamento pari all'85%. I dati ottenuti nel nostro studio, pur non valutando la colonizzazione animale, mostrano come a carico dell'ambiente l'andamento della presenza di MRSA sia comparabile ai dati ottenuti nei precedenti lavori: all'aumentare dell'età degli animali (fase di ingrasso) si assiste ad una diminuzione della proporzione dei campioni ambientali risultati positivi.

L'analisi condotta al macello pur valutando animali provenienti da un numero limitato di partite, conferma che negli allevamenti colonizzati la presenza di portatori nasali al macello è frequente. Di notevole interesse appare il fatto che, a fine macellazione, il riscontro di MRSA sulle carcasse risulta assai frequente.

Diversi Autori hanno dimostrato la contaminazione di prodotti a base di carne suina da parte di cloni di MRSA (Normanno et al., 2007; Weese et al., 2010 (b); van Loo et al., 2007; de Boer et al., 2009; Pu et al., 2009); sono poche però le segnalazioni di infezioni causate dall'ingestione di cibi contaminati da MRSA (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007).

CONCLUSIONI

Questo studio ha evidenziato che all'interno degli allevamenti suini colonizzati, la contaminazione ambientale da parte di MRSA è elevata. Le normali procedure di pulizia e disinfezione sembrano risultare per lo più inadeguate per una completa eliminazione di MRSA dai locali in cui i suini vengono stabulati. Tuttavia, appare evidente che tali operazioni contribuiscono a limitare la colonizzazione degli ambienti. Considerando i dati globalmente, i risultati migliori sono stati ottenuti nelle sale parto. E' noto che in questi reparti le operazioni di sanificazione e di vuoto sanitario sono generalmente più accurate. Pertanto è possibile affermare che un maggior rigore negli interventi di sanificazione potrebbe contribuire a ridurre la contaminazione ambientale. Quanto l'entità della riduzione della carica di MRSA negli ambienti possa incidere su una significativa diminuzione della proporzione di animali colonizzati al momento della loro uscita dagli ambienti, resta materia ancora da accertarsi.

I nostri risultati evidenziano quindi il ruolo fondamentale della pulizia degli ambienti per abbattere la potenziale fonte di colonizzazione per gli animali, ed evidenziano anche una probabilità di campioni ambientali positivi (e quindi possibilmente di carica ambientale) correlabile alle diverse classi di età degli animali, dimostrata dalla netta diminuzione di campioni positivi tra i locali di messa a terra pieni, in presenza quindi di animali, e i locali di ingrasso pieni. Tali ipotesi devono essere tuttavia avvalorate da un'analisi che prenda in considerazione contemporaneamente la presenza di MRSA a livello ambientale e degli animali.

I risultati riguardanti la presenza di MRSA sulle carcasse alla fine della macellazione supportano l'ipotesi di una potenziale contaminazione degli alimenti di origine suina da parte di cloni di MRSA. Ulteriori studi risultano quindi necessari per valutare il potenziale ruolo delle carni nella trasmissione all'uomo di MRSA di origine animale.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato nel contesto del Progetto di Ricerca Corrente anno 2008 "Epidemiologia dell'infezione da *Staphylococcus aureus* (MRSA) in allevamenti di suini e polli da carne" finanziato dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

- Brakstad O., Aasbakk K., Maeland J.A., (1992) "Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene". *J. Clin. Microbiol.* 30, 1654-1660.
- Battisti A., Franco A., Meriardi G., Hasman 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*, 2010 May 19;142(3-4):361-6
- de Boer E, Zwartkruis-Nahuis J.T., Wit B., (2009) 'Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat' *Int J Food Microbiol.* 134, 52-56.
- de Neeling A.J., van den Broek M.J.M., Splaburg E.C., van Santen-Verheuevel M.G., Dam-Deisz W.D.C., Boshuizen H.C., van de Giessen A.W., van Duijkeren E., Huijsdens X.W. (2007) "High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122,366-372.
- Guardabassi L., Stegger M., Skov R., (2007) "Retrospective detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *Vet Microbiol.* 122,384-386.
- Huijsdens X.W., van Dijke B.J., Spalburg E., van Santen-Verheuevel M.G., Heck M.E.O.C., Pluister G.N., Voss A., Wannet W.J.B., de Neeling A.J., (2006) "Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 26.

Jones T.F., Kellum M.E., Porter S.S., Bell M., Schaffner W., (2002) “An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 82-84.

Pan A., Battisti A., Zoncada A., Bernieri F., Boldini M., Franco A., Giorgi M., Iurescia M., Lorenzotti S., Martiniotti M., Monaci M., Pantosti A., (2009) “Community-acquired methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 15,845-847.

Pu S., Han F., Ge B., (2009) Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* 75, 265–267.

Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission Assessment of the Public Health significance of methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods, (2009) *The EFSA Journal*, 993, 1-73.

Sergio D.M.B., Koh T.H., Hsu L., Ogden B.E., Goh A.L.H., Chow P.K.H., (2007) “Investigation of methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research”. *J. Med. Microbiol.* 56, 1107-1109.

Rijen M.V., Keulen P.V., Kluytmans J., (2007). “Increase of pig and calf MRSA in a Dutch hospital”. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, S446-S447.

Smith T.C., Male M.J., Harper A.L., Kroeger J.S., Tinkler G.P., Moritz E.D., Capuano A.W., Herdwaldt L.A., Diekema D.J., (2009) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE*, 4, 1-6.

Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W., (2003) “Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*” *J. Clin. Microbiol.* 41, 4089-4094.

van Loo I.H.M., Diederer B.M.W., Savelkoul P.H.M., Woudenberg J.H.C., Roosendaal R., van Belkum A., Lemmens-den Toom N., Verhulst C., van Keulen P.H.J., Kluytmans J.A.J.W (2007) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands”. *Emerg. Infect. Dis.* 13,1753-1755.

Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M., (2005) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965-1966.

Weese J.S., Reid-Smiyh R., Rousseau J., Avery B., (2010b) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* contamination of retail pork” *CVJ*, 51, 749-752.

Weese J.S., Zwambag A., Rosendal T., Reid-Smiyh R., Frienship R., (2010a) “Longitudinal investigation on Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in piglets” *Zoonoses and public health*, 1-6.