

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SULLA COLONIZZAZIONE DA *Staphylococcus aureus* METICILLINO RESISTENTI (MRSA) NELL'ALLEVAMENTO SUINO

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY ON METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) COLONIZATION IN PIG FARMING

GALLETTI E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA), colonizzazione, allevamento suino

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), colonization, pig farming

Riassunto

Staphylococcus aureus meticillino resistente (MRSA) rappresenta un importante problema di Sanità Pubblica. E' stata dimostrata l'ampia diffusione a livello mondiale di MRSA nell'allevamento suino e come il suino sia implicato nella trasmissione del batterio all'uomo. Tuttavia poche sono le informazioni riguardanti il ruolo dell'ambiente nella diffusione del patogeno, il potenziale ruolo svolto dai prodotti alimentari nella diffusione di MRSA di origine animale e la dinamica della colonizzazione in allevamento.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati di tre differenti studi condotti in allevamento e al macello. Nel primo studio la valutazione della contaminazione ambientale nelle diverse fasi di allevamento prima e dopo pulizia dimostra che pur essendovi una differenza significativa tra i locali alla fine della fase di produzione (50,4% di campioni positivi) rispetto agli stessi locali puliti e disinfettati (19% dei campioni positivi), tali operazioni sono inadeguate per una completa eliminazione di MRSA. I risultati migliori sono stati ottenuti nelle sale parto dove tali procedure sono più accurate.

Il secondo studio ha evidenziato che alla fine della catena di macellazione la contaminazione di carcasse di animali, provenienti da allevamenti positivi per MRSA, è frequente con un range di campioni positivi del 20%-60%. Uno studio longitudinale, infine, ha dimostrato che la percentuale di soggetti positivi in allevamento è correlato all'età degli animali e che la fase critica per la colonizzazione dei suini si trova tra la quarta e l'undicesima settimana di vita.

Summary

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) represents a major problem for the Public Health. Several Authors demonstrated the role of pigs as reservoirs of MRSA for human infection. Currently MRSA has been identified in pigs in France, the Netherlands, Denmark, Singapore and Italy but little is known about the role of the environment in the spread of MRSA, the potential risk of contaminated food by MRSA and the age-related changes in MRSA colonization in pigs.

In this study, data collected from three studies conducted in pig herds and at the slaughterhouse are presented. In the first study the evaluation of the environmental presence of MRSA before (in the presence of animals) and after cleaning and disinfection from colonized herds, showed that 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. The second study conducted at the abattoir demonstrated that the MRSA contamination of pig carcasses from naturally colonized herds, at the end of the slaughter line is quite frequent. Finally, the longitudinal study in a pig farm showed that the percentage of MRSA positive animals is related to the age of the pigs (pigs colonization at 4th-11th weeks after birth).

INTRODUZIONE

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) è un batterio Gram-positivo resistente a tutti gli antibiotici β -lattamici. Infezioni umane sono state descritte inizialmente a livello ospedaliero a partire negli anni '70 mentre dagli anni '90 è stata osservata la diffusione di ceppi multiresistenti anche in soggetti non ospedalizzati, definiti come Community-acquired MRSA (CA-MRSA). Solo più recentemente, assieme all'incremento di infezioni umane causate da CA-MRSA, è stata evidenziata la colonizzazione da MRSA in diverse specie animali potenzialmente in grado di trasmettere il batterio all'uomo. 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 (van Rijen et al., 2007). In particolare, il *sequence type* chiamato ST398, frequentemente associate al suino, è emerso come un'importante causa di infezione da CA-MRSA in alcuni Paesi europei (van Rijen et al., 2008). Studi recenti hanno infatti documentato la trasmissione di MRSA tra suini ed operatori del settore suinicolo come veterinari, operai e loro famiglie (Voss et al., 2005; Huijsdens et al., 2006; Pan et al., 2009). In Italia è stata evidenziata colonizzazione nasale da MRSA nel 38% delle partite di suini macellati 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 un possibile veicolo di trasmissione di MRSA (The EFSA Journal, 2009).

Il presente studio, oggetto della tesi di Scuola di Specializzazione in "Ispezione degli Alimenti di Origine Animale" (Galletti, 2011), riporta i risultati di indagini condotte presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Bologna. I dati si riferiscono a tre studi svolti in allevamenti suini della Lombardia e dell'Emilia Romagna e al macello, che hanno avuto lo scopo di determinare la persistenza di MRSA, 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. Uno studio longitudinale è stato condotto in un allevamento della provincia di Modena, attraverso la raccolta di tamponi nasali effettuati su suini monitorati dalla nascita fino alla macellazione al fine di approfondire l'epidemiologia della colonizzazione da parte di MRSA nelle diverse classi di età e i potenziali effetti della tipologia di allevamento. L'identificazione della dinamica della colonizzazione da parte di MRSA, infatti, è un passaggio fondamentale per comprendere la trasmissione di questi batteri e per lo sviluppo di pratiche per il loro controllo.

MATERIALI E METODI

Studio 1:

Gli allevamenti sono stati arruolati in base ad un'analisi preliminare che aveva evidenziato la loro colonizzazione per MRSA. In totale sono stati considerati 6 allevamenti, 2 della provincia di Modena, 2 della provincia di Mantova, 1 della provincia di Verona e 1 della provincia di Brescia.

Nella tabella di seguito sono riportate le caratteristiche di ciascun allevamento insieme alle procedure di pulizia e sanificazione.

ID Allev.	n. scrofe	n. siti produzione	Tutto pieno -tutto vuoto	Rimozione materia organica	Uso detergenti	Lavaggio ad alta pressione	Uso di disinfettanti	Tempo di vuoto tra i gruppi
1	1.000	3	SI (completo in tutte le fasi)	SI	SI	SI (acqua calda in sala parto e svezzamento)	glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio	7 giorni
2	900	3	SI (completo in sala parto e svezzamento incompleto in magronaggio e ingrasso)	SI	SI	SI (acqua calda solo in sala parto)	Alchilammine	2 giorni in gabbie parto e svezzamento 5 giorni in magronaggio e ingrasso
3	2.000	2	SI (completo in tutte le fasi)	SI	Solo in gabbie parto	SI (acqua fredda in tutti i reparti)	glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio	1-3 giorni
4	1.000	1	Vedi allev. n. 2	SI	SI	SI (acqua calda in tutti i reparti)	alchilammine e sali quaternari d'ammonio	2 giorni
5	1.500	2	Vedi allev. n. 2	SI	SI	SI (acqua calda in tutti i reparti)	glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio	2 giorni
6	1.550	2	SI (completo in tutte le fasi)	SI	Solo in gabbie parto	SI (acqua calda in tutti i reparti)	Perossidi inorganici + acidi organici + detergente anionico	4 giorni

Tab. 1: Caratteristiche degli allevamenti

Tab. 1: Herds characteristics

Campioni di polvere sono stati raccolti nelle gabbie parto, nei box di svezzamento e nei locali di magronaggio e ingrasso tramite l'utilizzo di garze sterili (Sodibox®) di circa 500 cm². In ogni fase di produzione sono stati raccolti 10 campioni alla fine di ogni fase, ovvero in presenza di animali e in ambiente sporco, e 10 dopo le operazioni di pulizia e sanificazione, prima dell'introduzione di nuovi animali. Per ciascun allevamento sono stati raccolti 80 campioni ambientali per un totale di 480 campioni. L'età degli animali nelle diverse fasi di accrescimento erano comprese tra 0-28 giorni nelle sale parto, 24-75 giorni nello svezzamento, 65-120 giorni nel magronaggio e 110-280 giorni nell'ingrasso.

Studio 2:

La valutazione sulla presenza di MRSA sulle carcasse a fine macellazione è stata eseguita su 5 partite provenienti da 3 dei sei allevamenti precedenti (allevamenti 1, 2 e 3) e da due allevamenti di cui sono tuttora in corso le indagini in allevamento (allevamenti 7 e 8). Un allevamento si trova nella provincia di Modena e 4 nella provincia 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.

Studio 3:

Lo studio si è svolto in un allevamento a ciclo chiuso della provincia di Modena (allevamento 6 tab.1) precedentemente identificato come colonizzato da MRSA. L'allevamento è suddiviso in due siti. Nel sito 1 sono presenti 1550 scrofe e i suinetti in svezzamento, nel sito due sono presenti i locali di messa a terra ed ingrasso. 30 scrofe di diverso numero di parti sono state sottoposte a tampone nasale al 80° giorno di gestazione. Dagli stessi animali è stato prelevato un campione cutaneo tramite strofinamento della mammella con garze sterili (Sodibox®) 3 giorni dopo il parto. 10 suinetti di 6 scrofe (5 scrofe scelte a caso e l'unica risultata colonizzata al primo prelievo) sono stati marcati individualmente con marca auricolare e sottoposti a tampone nasale secondo la seguente tempistica: tre giorni dalla nascita; un giorno prima dello svezzamento (giorno 27); fine svezzamento (giorno 75); inizio ingrasso (giorno 120); metà ingrasso (giorno 180); macellazione dopo iugulazione (giorno 270). Inoltre, attraverso l'uso dei Sodibox® sono stati raccolti 30 campioni ambientali dalla sala gestazione in presenza delle scrofe e 10 campioni rispettivamente dalla sala parto, locali svezzamento, messa a terra e ingrasso. I campionamenti ambientali sono avvenuti negli ambienti pieni (presenza di animali) e vuoti (locali puliti e sanificati in assenza di animali) seguendo il percorso degli animali marcati durante il loro ciclo di crescita.

Procedure di laboratorio

I campioni raccolti durante i tre studi sono stati sottoposti alle seguenti procedure di laboratorio. I tamponi nasali prelevati al macello sono stati raggruppati in 6 pool da 10 per ogni partita. I campioni ambientali dei tre studi ed i tamponi nasali dello 3 sono stati invece 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 Triptone 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), 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

Per lo studio 1 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

Studio 1:

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%.

Nella figura 1 sono riportati i dati di positività considerando tutti i campioni positivi dei sei allevamenti, con la separazione tra locali pieni (sporchi) e locali vuoti (puliti).

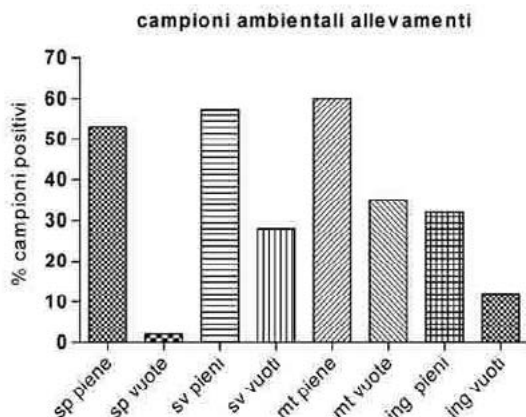


Grafico 1: percentuali di positività nei locali pieni e vuoti (**sp**: sala parto piena/vuota; **sv**: sala svezzamento piena/vuota; **mt**: locali messa a terra pieni/vuoti; **ing**: locali ingrasso pieni/vuoti).

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 emerge tuttavia dall'analisi nei vari reparti. Infatti, la probabilità di osservare un campione contaminato da MRSA nella 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 (Tabella 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

Tabella 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.

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

Nelle fasi di produzione 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 di 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.

Studio 2:

Per quanto riguarda i tamponi nasali raccolti dopo iugulazione, 6 pool (100%) sono risultati positivi in quattro 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), 60 % (allevamento 7) e 55% (allevamento 8).

Studio 3:

Dall'analisi dei tamponi nasali effettuati sulle scrofe, solo un animale è risultato positivo per MRSA. La raccolta di Sodibox® a livello della cute della mammella ha dato esito negativo per tutte le scrofe.

La ricerca di MRSA nei tamponi nasali effettuati nei suinetti di tre giorni ha evidenziato la positività di 1 solo soggetto (1,7%). Tale soggetto non apparteneva alla nidiata della scrofa risultata positiva per MRSA dal tampone nasale.

I tamponi del 27° giorno di età sono risultati tutti negativi, mentre, nelle fasi successive (alla fine del periodo di svezzamento e all'inizio dell'ingrasso) tutti i tamponi nasali dei suini si sono

dimostrati positivi per MRSA (75° e 120° giorno). Dopo 6 mesi dalla nascita (metà ingrasso, 180° giorno) i campioni positivi sono risultati 11 (18,3%). Al momento della macellazione su 59 campioni, 14 sono risultati positivi per MRSA (23,7%) (Grafico 2).

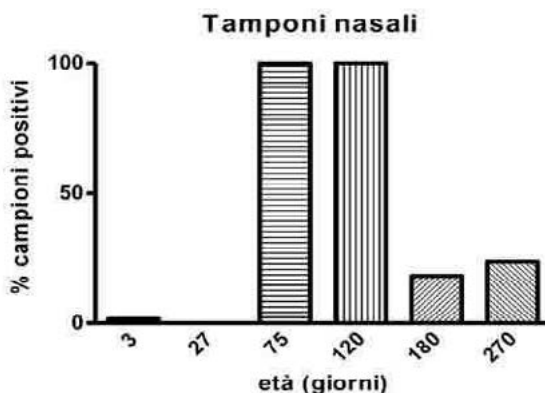


Grafico 2: Percentuali di positività dei tamponi nasali nelle diverse fasi di accrescimento
Graph. 2: Percentage of positive nasal swabs in the different phases

Per quanto riguarda la ricerca di MRSA nell'ambiente non sono stati riscontrati campioni positivi né a livello della sala gestazione, né nelle sale parto piene, né in quelle pulite e sanificate. Nelle gabbie di svezzamento piene sono risultati positivi 5 Sodibox® su 10 (50%) ed in quelle vuote 4 su 10 (40%). Nella fase di messa a terra sono stati individuati 5 campioni positivi nei locali pieni (50%) e 2 nei locali vuoti (20%). Nell'ultima fase, quella di ingrasso, i campioni positivi sia degli ambienti pieni che di quelli vuoti sono risultati pari a 1 (10%) (Grafico 3).

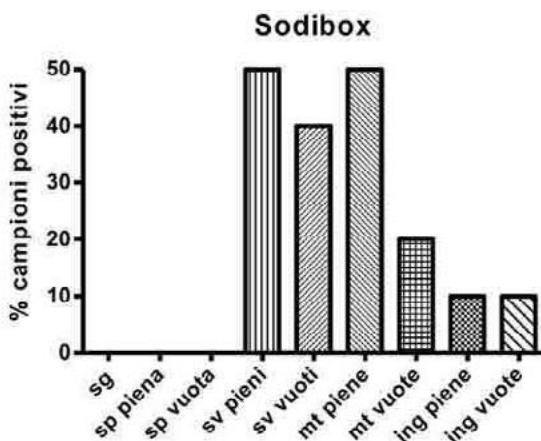


Grafico 3: Percentuali di positività nei locali pieni e vuoti. **sp:** sala parto piena/vuota; **sv:** sala svezzamento piena/vuota; **mt:** locali messa a terra o pieni/vuoti; **ing:** locali ingrasso pieni/vuoti.
Graph. 3: Percentage of positive samples in units with or without animals. **sp:** farrowing unit populated/empty; **sv:** weaning unit populated /empty; **mt:** growing unit populated /empty; **ing:** finishing units populated /empty.

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 innanzitutto evidenziata una sostanziale differenza 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).

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 (de Boer et al., 2008; van Loo et al., 2007; Weese et al., 2010a); sono poche però le segnalazioni di infezioni causate dall'ingestione di cibi contaminati da MRSA (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007).

Lo studio longitudinale condotto in allevamento apporta informazioni originali riguardo all'epidemiologia della colonizzazione da parte di MRSA nelle varie fasi di età dei suini. Ad oggi, infatti, non vi sono lavori scientifici che prendano in considerazione periodi di monitoraggio così prolungati (9 mesi) e che, soprattutto, considerino sia la colonizzazione animale che la contaminazione degli ambienti in cui gli animali sono stabulati. Smith et al., (2009) hanno campionato, attraverso tamponi nasali, 209 suini di 7 diversi gruppi di età. A nove e 12 settimane di vita la percentuale dei tamponi positivi era del 100% per poi abbassarsi successivamente: 90%, 50%, 63%, 50% e 36% a 15, 18, 21, 24 settimane e in suini adulti. Weese et al., (2010b) con uno studio longitudinale che ha coinvolto sia le scrofe che i suinetti nella fase di pre-svezzamento e di post-svezzamento hanno evidenziato una prevalenza totale nella fase di pre-svezzamento pari al 34,5%. In particolare ai giorni 1, 3, 7, 14 e 21 dopo la nascita la prevalenza dei suinetti era pari a 1%, 6,2%, 8,5%, 4,4% e 20%. Nella fase post-svezzamento la prevalenza totale era pari all'85% e pari al 34%, 65%, 50% e 42% rispettivamente ai giorni 28, 42, 56 e 70. Da questa indagine risulta inoltre che i suinetti nati da madri positive per MRSA a livello nasale nei giorni prima del parto o al momento del parto, presentano una probabilità maggiore di essere colonizzati. Tuttavia anche i suinetti nati da madri negative sono risultati positivi per MRSA nel corso dello studio. Nel presente studio non è stata osservata una correlazione tra la positività delle scrofe e quella dei suinetti; l'unico suinetto positivo nel primo campionamento (3 giorni dalla nascita) infatti è nato da una madre negativa per MRSA, mentre i suinetti nati dalla scrofa positiva sono risultati, in quel periodo di campionamento, negativi.

Nel corso dello studio è stato osservato un brusco innalzamento dei campioni positivi dei suini campionati alla fine dello svezzamento (100%). A circa 120 giorni dalla nascita (inizio ingrasso) i campioni positivi sono ancora il 100%, mentre alla fine dell'ingrasso (180° giorno) la prevalenza cala drasticamente passando al 18%, dato che viene praticamente confermato dal campionamento successivo (23%). L'andamento della prevalenza di MRSA nelle fasi di età, pur non essendo completamente sovrapponibile ai due lavori citati, è comunque paragonabile. Anche nella nostra indagine, infatti, sembra che la fase critica

per la colonizzazione sia tra la quarta e l'undicesima settimana di vita. In questo studio si è registrato un andamento analogo fra i tassi di positività dei campioni prelevati dagli animali e negli ambienti nelle diverse fasi di allevamento. Nel reparto gestazione e nelle sale parto non è stata evidenziata contaminazione ambientale e solo una scrofa su trenta è risultata colonizzata. Un suinetto su 60 è risultato colonizzato a 30 giorni di vita e nessuno su 60 alla fine del periodo sottoscrofa. Nel periodo successivo, nei locali di svezzamento, la prevalenza ha raggiunto il 100%. Il fatto che in tali locali, al momento dell'introduzione dei suinetti sia stata rilevata una contaminazione residua post-sanificazione, potrebbe essere alla base del netto aumento della prevalenza, suggerendo un ruolo importante dell'ambiente nel determinare la colonizzazione nasale nei soggetti naive. Nei locali di svezzamento e messa a terra si sono riscontrati i maggiori tassi di colonizzazione nasale e di campioni ambientali positivi. Nei reparti di ingrasso si assiste ad una diminuzione di entrambi i parametri. Resta da appurare con ulteriori studi se questa associazione possa essere estesa alla generalità degli allevamenti. Per quanto riguarda le informazioni scaturite dallo studio longitudinale si può ipotizzare, anche in relazione ad altri studi simili, che l'età e l'ambiente giochino un ruolo rilevante nella epidemiologia di MRSA. L'ipotesi che si può formulare sull'andamento della colonizzazione da MRSA è che questo dipenda sia da fattori ambientali ma anche da fattori che influiscono direttamente sull'animale come lo stress e l'adattamento alle diverse fasi e condizioni di allevamento.

CONCLUSIONI

L'analisi dei dati raccolti ha apportato importanti informazioni sulla dinamica di colonizzazione da MRSA nell'allevamento suino. Nello specifico tali studi hanno evidenziato che: 1) all'interno degli allevamenti di suini colonizzati, la contaminazione ambientale da parte di MRSA è elevata e che le normali procedure di pulizia e disinfezione sembrano risultare per lo più inadeguate per una completa eliminazione di MRSA dai locali. Considerando i dati globalmente, i risultati migliori sono stati ottenuti nelle sale parto. È noto che in questi reparti le operazioni di sanificazione e di vuoto sanitario sono generalmente più accurate. Un maggior rigore negli interventi di sanificazione potrebbe quindi 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. Questi risultati dimostrano anche una probabilità di campioni ambientali positivi (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.

2) 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 e, soprattutto, sarà interessante comparare da un punto di vista genetico i ceppi isolati durante i campionamenti in allevamento da quelli isolati al momento della macellazione.

3) Per quanto riguarda le informazioni scaturite dallo studio longitudinale si può affermare, anche in relazione ad altri studi simili, che l'età e l'ambiente giocano un ruolo fondamentale nella epidemiologia degli MRSA. L'ipotesi che si può formulare sull'andamento della colonizzazione da MRSA è che questo dipenda sia da fattori ambientali (procedure di pulizia e sanificazione) ma anche da fattori che influiscono direttamente sull'animale come lo stress e l'adattamento alle diverse condizioni di allevamento.

BIBLIOGRAFIA

- 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". *Vet Microbiol.* 2010 May 19;142(3-4):361-6
- 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.
- de Boer E, Zwartkruis-Nahuis J.T., Wit B. (2008) '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.
- Galletti E. (2011) "Indagine epidemiologica sulla colonizzazione da *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) nell'allevamento suino". Tesi della Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, presso l'Università degli studi di Bologna, anno accademico 2010-2011, 1-55.
- 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., Lorenzetti S., Martiniotti M., Monaci M., Pantosti A. (2009) "Community-acquired methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy". *Emerg. Infect. Dis.* 15,845-847.
- Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission Assessment of the Public Health significance of methicillin-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 methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research". *J. Med. Microbiol.* 56, 1107-1109.
- Smith T.C., Male M.J., Harper A.L., Kroeger J.S., Tinkler G.P., Moritz E.D., Capuano A.W., Herdwaltd L.A., Diekema D.J. (2009) "Methicillin-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., Diederik 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. (2007) "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands". *Emerg. Infect. Dis.* 13,1753-1755.

- van Rijen M.M., Keulen P.V., Kluytmans J. (2008) Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming”. *Clinical Infectious Diseases* 46, 261-263.
- van Rijen M. M, Keulen P.V., Kluytmans J. (2007) “Increase of pig and calf MRSA in a Dutch hospital” *Clin Microbiol Infect.* 13, S446-S447.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. (2005) “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming”. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965-1966.
- Weese J.S., Zwambag A., Rosendal T., Reid-Smiyh R., Frienship R. (2010a) “Longitudinal investigation on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in piglets” *Zoonoses and public health*, 1-6.
- Weese J.S., Reid-Smiyh R., Rousseau J., Avery B. (2010b) “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* contamination of retail pork” *CVJ.* 51, 749-752.