

EPIDEMIOLOGIA INTERSPECIFICA DI MRSA NELL'AMBITO SUINICOLO

INTERSPECIFIC EPIDEMIOLOGY OF MRSA IN PIG FARMING

DE FAVERI E.⁽¹⁾, RIMOLDI S.⁽²⁾, PAGANI C.⁽²⁾, SALA V.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica – Università di Milano;

⁽²⁾ Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche “L. Sacco” – Università di Milano

Parole chiave: MRSA, epidemiologia, suino, medico veterinario.

Key words. MRSA, epidemiology, pig, veterinarian.

Riassunto. Le popolazioni di MRSA sono classificate in rapporto all'origine, distinguendo *S. aureus* Healthcare-Acquired (HA), Community-Acquired (CA) e Livestock-Acquired (LA); per questi ultimi gli animali produttori di alimenti destinati all'uomo hanno un ruolo epidemiologico importante. Questo ha generato il sospetto che la zootecnia intensiva possa essere, per la frequenza e l'intensità d'impiego dei trattamenti antibatterici, un ambito elettivo della selezione clonale delle antibiotico-resistenze. La presenza di LA-MRSA nella produzione suinicola è oggi una certezza in molti Paesi e il suino è considerato un serbatoio di trasmissione verso l'uomo e gli altri animali domestici; infatti, gli allevatori e gli addetti alla produzione hanno un tasso di colonizzazione molto maggiore, rispetto al resto della popolazione. In questo lavoro è stata segnalata la presenza di MRSA nei suini da macello (2,3% di positività nelle amigdale), nelle scrofe (10% di positività nei tamponi nasali) e nei veterinari occupati in suinicoltura (25% di portatori nasali). Molti degli isolamenti dai suini e dall'uomo appartengono ai medesimi pattern genomici.

Summary. The populations of MRSA are classified in relation to their origin, distinguishing *S. aureus* Healthcare-Acquired aureus (HA), Community-Acquired (CA) and Livestock-Acquired (LA). For LA-MRSA livestock animals have an important epidemiological role. This has raised the suspicion that the intensive husbandry may be, for the frequency and intensity of use of antibacterial treatments, an elective field of clonal selection of antibiotic resistance. The presence of LA-MRSA in pig production is sure in many countries and the pig is considered a reservoir for transmission to humans and other animals. In fact, farmers and production workers have a higher rate of colonization than the rest of the population. This work reports the presence of MRSA in slaughter pigs (2.3 % positivity of the tonsils), sows (10 % positivity of nasal swabs) and veterinarians employed in pig production (25% of nasal carriers). Many of the isolates from pigs and man belong to the same genomic patterns.

INTRODUZIONE

I primi cloni resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati segnalati poco l'introduzione della meticillina nella pratica clinica, ma fino al 1980 la loro rilevanza è stata marginale (Brumfitt & Hamilton-Miller, 1989); solo in seguito, gli stafilococchi aurei meticillino-resistenti (MRSA) sono stati inseriti tra i principali agenti d'infezioni ospedaliere nel mondo. Oggi, negli Stati Uniti e in Europa fino al 30-50% degli stafilococchi aurei responsabili d'infezioni ospedaliere sono meticillino-resistenti (EARSS, 2008; NNIS, 2002) mentre nei Paesi Bassi e in Scandinavia i tassi di resistenza sono inferiori al 3%, grazie a piani di controllo e prevenzione correttamente gestiti.

In seguito, le popolazioni di MRSA sono state classificate in rapporto all'ambito di origine e/o di maggiore circolazione, distinguendo quindi *S. aureus* Healthcare-Acquired (HA), Community-Acquired (CA) e Livestock-Acquired (LA); sono questi ultimi che vedono coinvolti, con un ruolo epidemiologicamente decisivo, gli animali produttori di alimenti destinati all'uomo e che hanno generato l'ipotesi che la zootecnia intensiva possa essere, per la frequenza e l'intensità d'impiego dei trattamenti antibatterici, un ambito elettivo della selezione clonale delle antibiotico-resistenze. A parziale conferma di questa indicazione, un rapporto olandese ha mostrato un tasso di colonizzazione molto maggiore negli allevatori e negli addetti alla produzione, rispetto al resto della popolazione (Voss *et al.*, 2005); altre successive indagini hanno confermato questa indicazione nella stessa Olanda (de Neeling *et al.*, 2007; Huijsdens *et al.*, 2006; van Duijkeren *et al.*, 2008) in Belgio (Denis *et al.*, 2009) in Canada (Khanna *et al.*, 2007) in Germania (Witte *et al.*, 2007) e negli Stati Uniti (Smith *et al.*, 2008b).

La presenza di LA-MRSA nella produzione suinicola è oggi una certezza in molti Paesi e il suino è ormai considerato un potenziale serbatoio di trasmissione verso l'uomo e gli altri animali domestici; le sue più probabili funzioni epidemiologiche sarebbero la selezione delle varianti LA resistenti o addirittura la conservazione e la diffusione di quelle CA provenienti dall'uomo (Cui *et al.*, 2009; Wagenaar *et al.*, 2009).

Il contatto con i maiali è dunque ritenuto un fattore di rischio rilevante per la colonizzazione dell'uomo (Lewis *et al.*, 2008; Van Rijen *et al.*, 2008) al punto da assumere rilevanza socio-sanitaria in alcuni Paesi: in Olanda, la diffusione dei patotipi più frequenti nell'ambito zootecnico, in pratica nulla nel 2002, ha raggiunto il 21% nel 2006 (van Duijkeren *et al.*, 2008). Il fenomeno è certamente associato al contatto continuo con gli animali, poiché la colonizzazione riguarda particolarmente i veterinari, gli allevatori e i loro familiari.

Ciononostante, i fattori di rischio in suinicoltura sono stati indagati solo marginalmente: la continuità del lavoro a contatto con i suini è il principale, ma la qualità sanitaria del management può essere un fattore di amplificazione o riduzione.

Le indagini sulla localizzazione di MRSA nei veterinari hanno evidenziato una prevalenza relativamente elevata, sempre superiore a quella della popolazione generale; la mappatura dei cloni batterici ha confermato l'ipotesi dell'esposizione professionale in ippiatria e nell'ispezione degli alimenti di origine animale (Anderson *et al.*, 2008; Christianson *et al.*, 2007) mentre non esistono indicazioni certe nei veterinari occupati in suinicoltura.

Ciò ha motivato l'indagine di cui riportiamo i primi risultati in questa nota; il lavoro ha interessato i suini (scrofe in allevamento e maiali al macello) e un gruppo di veterinari che frequentano professionalmente gli allevamenti e i macelli industriali del settore.

Per una maggiore comprensione epidemiologica, sono stati mappati gli isolamenti, per verificare la presenza dello stesso genotipo nel suino e nell'uomo e quindi una circolazione interspecifica favorita dal sistema di produzione.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 28 Medici Veterinari, la cui attività professionale si svolge esclusivamente nel comparto suinicolo; il campione ha compreso Veterinari Aziendali, professionisti operanti per conto di Companies commerciali del settore suinicolo e Veterinari del Servizio Veterinario delle Aziende Sanitarie Locali operanti presso gli stabilimenti di macellazione. Il prelievo è avvenuto, previo consenso informato, mediante tampone nasale monolaterale.

Le procedure di campionamento sono state eseguite in osservanza dell'articolo 13 del Decreto Legislativo n° 106 del 30 giugno 2006 (Codice in materia di protezione dei dati personali); ogni individuo ha sottoscritto due moduli, fornendo il proprio consenso informato

alla procedura e al trattamento dei dati personali. Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Milano.

Il campionamento sui suini è stato invece condotto in tre differenti stabilimenti di macellazione dell'Italia settentrionale; sono state esaminate in totale dieci partite di suini pesanti da macello, provenienti da allevamenti del Piemonte e della Lombardia. Il prelievo delle tonsille palatine è stato eseguito in catena di sezionamento; sono state prelevate e inserite in un contenitore sterile monouso individuale 486 tonsille, provenienti dal 50% dei 974 suini delle partite di macellazione considerate. Tutti i campioni dello stesso lotto di macellazione sono stati mantenuti uniti.

In due allevamenti a ciclo chiuso completo, rispettivamente situati nelle provincie di Cremona e Pordenone, sono stati eseguiti tamponi nasali a 30 scrofe in sala parto, per ciascuno di essi. Tutti i tamponi nasali sono stati eseguiti mediante tampone sterile monouso con terreno di trasporto tipo Ames W/OCH (Oxoid Italia); la manovra è stata eseguita in modo asettico e non traumatico, evitando qualsiasi contatto contaminante. I tamponi sono stati immediatamente refrigerati (4-8°C) e in queste condizioni recapitati entro le 24 ore successive al laboratorio d'analisi.

I prelievi di origine animale sono stati recapitati al laboratorio di Patologia Suina del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica dell'Università di Milano, mentre i campioni di provenienza umana sono stati consegnati al Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'Azienda Ospedaliera e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano.

Il protocollo batteriologico-diagnostico è stato il medesimo, indipendentemente dalla provenienza e dall'origine dei campioni.

Tamponi nasali

- Semina diretta in piastra su terreno MSA2 Gélose Chapman2 (Biomerieux, Francia) e su terreno selettivo Oxacillin-Salt Screen Agar (Biolife Italiana).
- Incubazione a 37°C per 18-24 ore.
- Lettura e interpretazione. MSA2: gli stafilococchi coagulasi-positivi (*S. aureus*) producono colonie con alone giallo, mentre i coagulasi-negativi hanno colonie bianche e non comportano viraggio del terreno Oxacillin-Salt Screen Agar: i ceppi di stafilococchi che crescono su questo terreno sono da considerare oxacillino-resistenti (la resistenza è estensibile alla meticillina e alla nafcillina). La valutazione crociata di crescita sui due terreni permette di individuare lo *S. aureus* meticillino resistente (MRSA)
- I ceppi isolati sono stati congelati a -20°C in glicerolo per una settimana e successivamente replicati su Tryptic Soy Agar (Biomerieux, Francia) prima dell'indagine biomolecolare.

Tonsille (da suini al macello)

- Omogeneizzazione mediante Stomacher (PBI Italia) previa preparazione 1:10 (P/V) in soluzione fisiologica.
- Semina, identificazione e preparazione per identificazione biomolecolare analoga a quella applicata ai tamponi nasali.

Biologia molecolare

I ceppi meticillino-resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati analizzati mediante rep-PCR (DiversiLab System - Biomerieux, Francia) presso il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'A.O e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano; attraverso questa tecnica è possibile collocare gli isolamenti simili in pattern genotipici differenti tra loro.

La sua applicazione prevede tre passaggi successivi: l'estrazione del DNA batterico (tramite UltraClean® Microbial DNA Isolation kit - Biomerieux, Francia), la sua amplificazione mediante rep-PCR e il rilevamento dei DNA fingerprinting mediante elettroferogramma. Attraverso un software dedicato (DiversiLab - Biomerieux, Francia) si procede quindi alla comparazione dei fingerprint dei diversi campioni e alla loro catalogazione nei pattern.

RISULTATI

Batteriologia

I risultati disponibili sono stati organizzati in Tabella 1; essi riguardano gli isolamenti dai tamponi nasali delle scrofe e dalle amigdale prelevate in macello, oltre a quelli dai tamponi nasali eseguiti sui medici veterinari professionalmente coinvolti nella filiera suinicola.

Soggetto prelevato	Prelievo	N. Campioni	Positivi	Negativi	% Positività
Medici Veterinari	T. nasale	28	7	21	25
Scrofe in azienda	T. nasale	60	6	54	10
Maiali da macello	Amigdale	486	11	475	2,3

Tabella 1. Categorie, materiali diagnostici e campioni positivi.

Table 1. Categories, diagnostic materials and positive samples.

Biologia molecolare

I risultati ottenuti mediante Diversilab sono riportati in Figura 1 e organizzati in Tabella 2; per maggiore chiarezza, ricordiamo qui che il sistema utilizzato permette di verificare il livello di similitudine del disegno genomico degli isolamenti, esprimendo una serie di “pattern” all’interno dei quali si collocano ceppi tra loro affini.

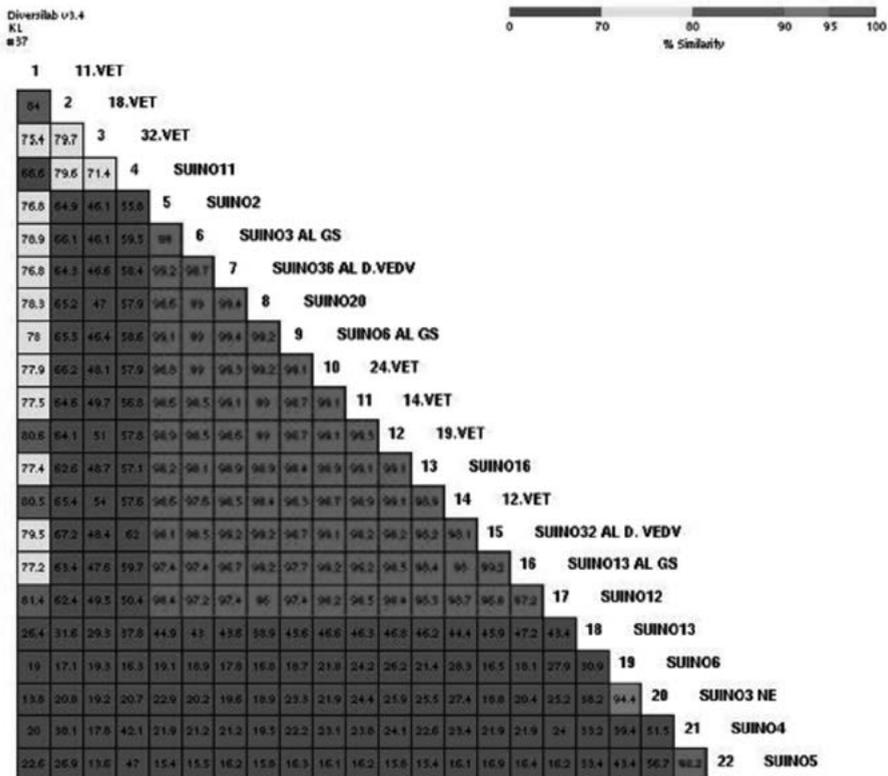


Figura 1. Similitudine genomica tra gli isolamenti da uomo e suino.

Figure 1. Genomic similarity among isolates from humans and pigs.

Sono stati sottoposti a rep-PCR 22 stipiti di MRSA: 7 sono stati isolati da veterinari e 15 da suini; l'analisi mediante Diversilab li ha collocati in 8 pattern, all'interno dei quali si sono distribuiti come indicato in Tabella 2.

Pattern	N. isolamenti	Provenienza
1	1	Veterinario
2	1	Veterinario
3	1	Veterinario
4	1	Suino
5	13	4 Veterinario, 9 Suino
6	1	Suino
7	2	Suino
8	2	Suino

Tabella 2. Suddivisione degli isolamenti nei pattern genomici.

Table 2. Breakdown of isolates among the genomic patterns.

È evidente come il pattern 5 sia quello numericamente più consistente, comprendendo ben 13 isolamenti; inoltre, è anche l'unico nel quale sono rappresentati MRSA provenienti sia dal suino, sia dell'uomo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ben 13 isolamenti sui 22 sottoposti ad analisi genomica si sono collocati nel pattern numero 5, che comprende ceppi derivati sia dai maiali da macello e dalle scrofe, sia da 4 medici veterinari; questi ultimi, portatori di MRSA a livello nasale, sono in tre casi responsabili diretti del management di grossi insediamenti suinicoli intensivi della pianura padana (localizzati a Brescia, Mantova e Modena) mentre il quarto è impiegato a tempo pieno in una macello industriale di suini. Il denominatore comune del loro stato di portatori è la frequentazione continua di ambiti diversi della filiera produttiva, che presuppongono comunque un contatto continuativo con i suini.

Le coppie di isolamenti dal suino collocate nei pattern 7 e 8, provengono da allevamenti territorialmente distanti e differenti per indirizzo produttivo; anche questa indicazione è molto interessante e potrebbe presupporre l'esistenza di un meccanismo di selezione dei cloni batterici, legato più a caratteristiche generali della gestione suinicola che a situazioni esclusive di ogni allevamento.

Nel pattern 5 questa indicazione si rafforza e amplifica per la presenza contemporanea degli isolamenti dai veterinari, che suggerisce la possibilità che la selezione di MRSA genomicamente simili anche in territori anche distanti tra loro, sia in grado di espandersi fino a coinvolgere anche le categorie umane a esposizione occupazionale.

Quanto fin qui disponibile in termini di risultati consente di confermare l'ipotesi che ha motivato questo progetto di ricerca, vale a dire l'esistenza di un percorso epidemiologico delle antibiotico-resistenze, lungo il quale la selezione avviene in ambito animale e l'esposizione professionale dell'uomo legata specificatamente a fattori di rischio non solo ambientali, può rappresentare la via d'accesso alla circolazione interumana.

Per altre conferme, sarà indispensabile includere altre categorie a rischio, come allevatori, loro familiari e dipendenti, valutando il tempo di contatto, la sua continuità e la ciclicità, ma anche considerando tempi e modalità di sopravvivenza di *S. aureus* negli ambienti di lavoro; ugualmente importante sarebbe valutare il rischio del personale addetto alle preparazioni mangimistiche, considerando tempi e frequenza di contatto con le premiscele antibiotiche.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson M.E., Lefebvre S.L., Weese J.S. (2008). Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Vet. Microbiol.* 129:410-417.
- Brumfitt W., Hamilton-Miller J. (1989). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 320:1188-96.
- Christianson S., Golding G., Campbell J., Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Mulvey M. (2007). Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 45:1904-1911.
- Cui S., Li J., Hu C., Jin S., Li F., Guo Y., Ran L., Ma Y. (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:680-683.

- de Neeling A., van den Broek M., Spalburg E., van Santen-Verheuevel M., Dam-Deisz W., Boshuizen H., van de Giessen A., van Duijkeren E., Huijsdens X. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122:366-372.
- Denis O., Suetens C., Hallin M., Catry B., Ramboer I., Dispas M., Willems G., Gordts B., Butaye P., Struelens M.J. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infect. Dis.* 15:1098-1101.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (2008). Annual Report. Bilthoven, Netherlands: EARSS; 2009.
- Huijsdens X., van Dijke B., Spalburg E., van Santen-Verheuevel M., Heck M., Pluister G., Voss A., Wannet W., de Neeling A. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:26.
- Khanna T., Friendship R., Dewey C., Weese J.S. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.* 128:298-303.
- Lewis H.C., Mølbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau M., Sørum M., Skov R.L. (2008). Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cc398 infections in humans, Denmark. *Emerging. Infect. Dis.* 14:1383-1389.
- NNIS (2002). National Nosocomial Infections Surveillance Report. Data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am J Infect Control* 2002;30: 458–75.
- Smith T.C., Male M.J., Harper A.L., Moritz-Korolev E., Kroeger J.S., Diekema D.J., Herwaldt L.A. (2008). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in the midwestern United States. International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta.
- van Duijkeren E., Moleman M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M., Mullem J., Troelstra A., Fluit A.C., van van Loo I., Huijsdens X.W., Tiemersma E., de Neeling A.J., van de Sande-Bruinsma N., Beaujean D., Voss A., Kluytmans J. (2007a). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin. *Emerging Infect. Dis.* 13:1834-1839.
- van Rijen M.M., Bosch T., Heck M.E., Kluytmans J.A. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and transmission in a Dutch hospital. *J. Hosp. Infect.* 72:299-306.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging. Infect. Dis.* 11:1965-1966.
- Wagenaar J.A., Yue H., Pritchard J., Broekhuizen-Stins M., Huijsdens X., Mevius D.J., Bosch T., van Duijkeren E. (2009). Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet. Microbiol.* 139:405-409.
- Witte W., Strommenger B., Stanek C., Cuny C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, central Europe. *Emerging Infect. Dis.* 13:255-258.