

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN CEPPI DI STREPTOCOCCUS SUIIS ISOLATI NEL SUINO NEL PERIODO 2004-2014

LUPPI A.^[1], BONILAURI P.^[1], MAIOLI G.^[1], GHERPELLI Y.^[1], DOTTORI M.^[1]

^[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER) ~ Reggio Emilia ~ Italy*

Keywords: Streptococcus suis, antibiotic-resistance, swine

Riassunto

Trecento-ventiquattro ceppi di Streptococcus suis isolati da casi di streptococcosi nel suino in Italia, nel periodo 2004-2014, sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità a diversi antibiotici impiegando il metodo della disco diffusione (Kirby-Bauer). I ceppi sono stati analizzati per la loro suscettibilità a 8 antimicrobici: lincomicin (2 µg), tilosina (30 µg), ampicillina (10 µg), penicillina (6 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg), cefalexina (30 µg) e ceftiofur (30 µg). La maggior parte degli isolati erano sensibili alla ampicillina, penicillina, amoxicillina + acido clavulanico, cefalexina e ceftiofur, mentre bassi livelli di sensibilità sono stati registrati per lincomicina, tilosina e tetraciclina. Il tasso di suscettibilità dei ceppi S.suis al trimetoprim-sulfametossazolo ha mostrato un certo grado di variabilità a seconda dell'anno di isolamento. Le tendenze relative alla suscettibilità dei ceppi di S.suis isolati nel periodo 2004-2014 ai singoli antimicrobici, non hanno mostrato alcuna variazione statisticamente significativa nel periodo in esame.

Abstract

The antimicrobial susceptibility of 324 Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in Italy in the period 2004-2014 was determined by disc diffusion method (Kirby-Bauer). The strains were analysed for their susceptibility to 8 antimicrobials: lincomycin (2 µg), tylosin (30 µg), ampicillin (10 µg), penicillin (6 µg), tetracycline (30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1,25/23,75 µg), cephalexin (30 µg) and ceftiofur (30 µg). Most of the S.suis isolates were susceptible to ampicillin, penicillin, amoxicillin+clavulanic acid, cephalexin and ceftiofur, while very low levels of sensitivity were recorded for lincomycin, tylosin and tetracycline. The rate of susceptibility of S.suis strains to trimethoprim-sulphamethoxazole showed a certain degree of variability according to the year of isolation. The trends in susceptibility of S.suis strains isolated from 2004 to 2014 to individual antimicrobials did not show any statistically significant variation over the period considered.

INTRODUZIONE:

Streptococcus suis è uno dei principali patogeni del suino ed è responsabile di diverse forme patologiche che includono quadri di meningite, di artrite, di pericardite, di polisierosite e di polmonite, correlate o meno a setticemia. Attualmente la streptococcosi rappresenta una delle problematiche sanitarie prevalenti e di maggior interesse nell'allevamento suino, per le quali ci si rivolge frequentemente al laboratorio diagnostico per l'isolamento del patogeno e per la successiva determinazione in vitro della sensibilità agli antibiotici. La patologia da S.suis è generalmente osservata nel periodo circostante lo svezzamento o inizio magronaggio, mentre in animali all'ingrasso si possono incontrare forme di endocardite ulcerosa-poliposa, che per la particolare conformazione macroscopica vengono anche definite a "cavolfiore". La malattia ha diffusione mondiale e causa importanti perdite economiche

nell'allevamento suino. La classificazione in sierotipi di *S.suis*, basata sulla identificazione degli antigeni capsulari, ha evidenziato una diversa distribuzione di questi tra i diversi paesi. In numerosi paesi Europei il sierotipo 2 è risultato quello isolato con maggiore frequenza, con alcune eccezioni come osservato per il sierotipo 9 risultato, dagli inizi del 2000, il più frequente in casi di streptococcosi in Germania, Olanda, Belgio e Spagna (6,7). Attualmente gli strumenti per il controllo della problematica sono l'impiego di vaccini stabulogeni e l'utilizzo della terapia antibiotica. Alcuni dei comuni antibiotici utilizzati nel trattamento e "prevenzione" della streptococcosi hanno evidenziato una minore attività a causa di un incremento dei fenomeni di antibiotico-resistenza tra i ceppi di *S.suis* (1,3). Il profilo di resistenza agli antibiotici è stato precedentemente descritto in ceppi di *S.suis* isolati da suini con forme respiratorie (6), tuttavia scarseggiano dati relativi alla sensibilità agli antibiotici di ceppi isolati da casi di streptococcosi. Nel presente lavoro si riportano i dati di antibiotico-resistenza di 324 ceppi di *S.suis* isolati nel periodo 2004-2014 da casi di streptococcosi nel suino.

MATERIALI E METODI:

Ceppi batterici

Nel presente studio sono stati inclusi 324 ceppi di *Streptococcus suis* provenienti dall'attività diagnostica di routine della sezione di Reggio Emilia (IZSLER) nel periodo 2004-2014. I ceppi batterici sono stati ottenuti dalla semina di materiale patologico prelevato da suini con streptococcosi (meningite, artrite, pericardite, polisierosite e setticemia) ed appartenenti ad allevamenti ubicati nel Nord Italia. Per ogni anno di isolamento non più di due ceppi sono stati inclusi nello studio se provenienti dallo stesso allevamento. L'isolamento di *S.suis* è stato eseguito su terreno colturale agar sangue con incubazione in termostato a 37°C. La crescita di colonie per morfologia riferibili al genere *Streptococcus* sono state identificate tramite metodi biochimici e sierologici standardizzati.

Sensibilità agli antibiotici

I ceppi di *S.suis* isolati sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di un pannello di 8 antibiotici: lincomicina (2 µg), tilosina (30 µg), ampicillina (10 µg), amoxicillina+acido clavulanico (20 µg/10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg), cefalexina (30 µg) e ceftiofur (30 µg). L'antibiogramma secondo Kirby Bauer è stato eseguito seguendo un metodo di prova interno basato su standards noti forniti dal Clinical Laboratory Standard Institute (2,4,5) e l'interpretazione ha utilizzato le chiavi interpretative internazionalmente riconosciute (2,4,5). Gli antibiogrammi hanno fornito pertanto, per ogni antibiotico impiegato, un risultato qualitativo espresso come "S, R o I" a seconda che il ceppo batterico in esame abbia mostrato rispettivamente sensibilità, resistenza o una condizione intermedia tra le prime due, ad una determinata molecola antibiotica. I controlli di qualità dei test di suscettibilità sono stati eseguiti utilizzando due ceppi ATCC: *E.coli* ATCC 25922 e *S.aureus* ATCC 25923.

Analisi statistica

Il tasso di sensibilità nei confronti di ciascun antibatterico è stato calcolato per ogni anno eseguendo il rapporto tra il numero di ceppi di *S.suis* sensibili e il numero totale di ceppi testati nei confronti di un determinato antibiotico. Attraverso l'impiego di un test chi-quadrato per trend lineare (regressione lineare utilizzando minimi quadrati ponderati), software Intercooled stata 7, è stato valutato l'eventuale trend in aumento o in diminuzione della sensibilità di ogni antibiotico nel periodo considerato. Le differenze sono state considerate statisticamente significative con $P < 0.05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE:

Il tasso di sensibilità agli antibiotici testati ed il relativo trend dei ceppi di *S.suis* isolati tra il 2004 ed il 2014 nei confronti di ogni antimicrobico impiegato sono riportati in tabella 1. I ceppi di *S.suis* testati hanno evidenziato diversi livelli di sensibilità a seconda delle molecole testate. In termini generali è possibile affermare che esistono due categorie di antibiotici che mostrano differenti livelli di attività nei confronti di *S.suis*. Nel primo gruppo si collocano ampicillina, penicillina, amoxicillina+acido clavulanico, ceftiofur, cefalexina, e trimetoprim+sulfametossazolo con livelli di sensibilità medio-alti. Tra queste molecole, l'amoxicillina+acido clavulanico e il ceftiofur sono quelle caratterizzate da maggiore efficacia, con percentuali di sensibilità, tra i ceppi testati nel periodo considerato, frequentemente del 100%. Nel secondo gruppo, invece, molecole come la tilosina, la lincomicina e la tetraciclina sono accomunate da scarsa attività nei confronti del patogeno.

Per quanto riguarda la valutazione di un possibile trend di diminuzione o aumento della sensibilità di *S.suis* nei confronti delle molecole testate, non è stata registrata nessuna variazione statisticamente significativa nel periodo considerato (2004-2014) (tabella 1).

Nel presente lavoro è riportata la sensibilità ad un pannello di antimicrobici di ceppi di *S.suis* isolati da casi di streptococcosi del suino. Come atteso i ceppi testati hanno mostrato elevata sensibilità all'ampicillina, che essendo molecola prototipo per l'amoxicillina in vitro, dev'essere presa come riferimento anche per quest'ultima. Questo dato, unitamente all'elevata attività anche della penicillina, riscontrata nel presente lavoro, conferma l'efficacia dei β -lattamici nel controllo e trattamento della streptococcosi nel suino attraverso medicazioni strategiche e interventi terapeutici in caso di comparsa della problematica. A questo proposito l'associazione amoxicillina + acido clavulanico, la cefalexina e il ceftiofur (considerata molecola prototipo per le cefalosporine a spettro esteso) hanno mostrato nel corso degli anni una costante elevata attività nei confronti del patogeno. I dati sopracitati sono in linea con quanto riportato da Wisselink et al. In uno studio condotto su 384 ceppi di *S.suis* isolati tra la metà e la fine degli anni '90 in 7 paesi Europei (Belgio, UK, Francia, Italia, Germania, Spagna e Olanda). In questo studio tutti i ceppi testati sono risultati sensibili a ceftiofur, cefquinome, enrofloxacin, florfenicolo e penicillina. Appare interessante sottolineare che fra questi agenti antimicrobici ceftiofur, cefquinome e penicillina hanno evidenziato valori di MIC₉₀ al di sotto o corrispondente alla concentrazione più bassa di antibiotico testata (6). Questi risultati sono in accordo con numerosi altri studi che riportano percentuali di sensibilità molto elevate o assenza di resistenze tra ceppi di *S.suis* nei confronti di penicillina, amoxicillina, ceftiofur, florfenicolo e gentamicina (3). Trimetoprim + sulfametossazolo ha evidenziato livelli di sensibilità medio-alti con una certa variabilità tra gli anni considerati, senza tuttavia mostrare un trend in aumento o diminuzione nel periodo considerato. Ritornando ai risultati dello studio di Wisselink et al., si sottolinea come tra i ceppi di *S.suis* inclusi nello studio il 6% abbia evidenziato resistenze nei confronti di trimetoprim + sulfametossazolo.

Dalla valutazione dei dati riportati in tabella 1 si rilevano elevati livelli di resistenza nei confronti di tetraciclina, tilosina e lincomicina. I risultati ottenuti sono in accordo con quanto riportato in letteratura, dove scarsa attività nei confronti di *S.suis* si riscontrano per tetraciclina e tilmicosina, con percentuali di ceppi resistenti rispettivamente del 75,1% e 55,3% (6). Non sorprende pertanto che il pattern di multiresistenza osservato con maggiore frequenza nei ceppi di *S.suis* sia caratterizzato dalla contemporanea resistenza nei confronti di tetracicline, sulfonamidi, macrolidi e lincosamidi (7).

I livelli di resistenza osservati nel presente studio nei confronti di tetraciclina e trimetoprim + sulfametossazolo, se comparati con i risultati riportati da Wisselink et al., appaiono

significativamente più elevati. Occorre, a questo proposito, considerare che gli isolati di *S.suis* utilizzati nello studio sopraccitato risalgono agli anni '90 e quindi i dati di MIC riportati non necessariamente riflettono l'attuale suscettibilità agli antibiotici dei ceppi di *S.suis* attualmente circolanti nel suino. Resistenze nei confronti di macrolidi/lincosamidi e tetracicline sono state frequentemente descritte in letteratura per ceppi di *S.suis*. Marie et al., riportano tassi di sensibilità del 20% per doxicilina e 30% per tilosina e lincomicina (3). Risultati simili sono stati ottenuti sempre in Francia da Morvan et al., dove in uno studio condotto su 400 ceppi isolati da casi di streptococcosi, il 38% risultava sensibile alla lincomicina e solo il 18% alla tetraciclina (3). In uno studio Spagnolo più dell'87% dei ceppi di *S. suis* isolati erano resistenti a tetracicline, sulfonamidi, macrolidi (7). A questo proposito appare interessante sottolineare come le resistenze osservate nei confronti di tetraciclina, lincomicina e tilosina sono state precedentemente descritte in Danimarca e Svezia, sia su ceppi datati, isolati tra il 1967 e il 1981 sia in ceppi più recenti, isolati tra il 1992 e 1997 (1). L'emergenza legata a queste resistenze sarebbe quindi piuttosto datata ed è da considerarsi come il probabile risultato dell'utilizzo intensivo di macrolidi e tetracicline nel tempo. A questo proposito, quindi, non sorprende il dato ottenuto nel presente lavoro e descritto in tabella 1, dove si rilevano per queste molecole (tetraciclina, lincomicina e tilosina) costantemente elevati livelli di resistenza, che con ogni probabilità sono emersi e si sono consolidati molti anni prima rispetto al periodo considerato nel presente lavoro. Andando a valutare il trend relativo alla suscettibilità dei ceppi di *S.suis* isolati nel periodo 2004-2014 ai singoli antimicrobici, non sono state evidenziate variazioni statisticamente significative, nel periodo di esame, per gli antibiotici considerati. I risultati del presente lavoro confermano le osservazioni di altri Autori (1,3,6,7) che riportano l'insorgenza di fenomeni di resistenza in ceppi di *S.suis*, descrivendo tuttavia una condizione relativamente stabile ed in particolare caratterizzata dall'assenza di variazioni significative della resistenza agli antibiotici di ceppi isolati nel periodo compreso tra il 2004 ed il 2014.

ANTIBIOTICI	ANNI											STATISTICA		
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	r	R ²	p
Amoxicillina + Ac.Clavulanico	100%	100%	100%	100%	96%	100%	97%	96%	100%	100%	95%	-0,06	0,0041	n.s.
Penicillina	75%	71%	68%	85%	68%	89%	70%	69%	73%	92%	82%	-0,022	0,0005	n.s.
Ampicillina	82%	78%	84%	90%	76%	95%	81%	90%	90%	92%	86%	0,039	0,0015	n.s.
Cefalexina	100%	94%	92%	97%	84%	89%	86%	100%	95%	92%	86%	-0,099	0,0099	n.s.
Ceftiofur	100%	98%	97%	100%	88%	100%	95%	100%	98%	100%	92%	0,0029	0,0000	n.s.
Lincomicina	21%	0%	6%	3%	8%	21%	11%	10%	5%	8%	3%	-0,029	0,0008	n.s.
Tetraciclina	6%	0%	8%	3%	0%	11%	0%	7%	2%	4%	5%	-0,002	0,0000	n.s.
Tilosina	7%	6%	19%	13%	4%	16%	8%	10%	5%	8%	8%	-0,062	0,0038	n.s.
Trimetoprim + Sulfametossazolo	65%	76%	51%	64%	83%	58%	54%	48%	66%	71%	65%	-0,068	0,0046	n.s.

Tabella 1: Percentuale di ceppi di *S.suis* risultati sensibili ai diversi antibiotici impiegati nello studio nel periodo 2004-2014

BIBLIOGRAFIA:

1. Aarestrup F.M., Rasmussen S.R., Artursson K., Jensen N.E. (1998). Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Vet. Microbiol.* 63, 71-80.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved standard, 3rd edn. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
3. Marie J., Morvan H., Bertthelot-Herault F., Sanders P., Kempf I., Gautier-Bouchardon A.V., Jouy E., Kobish M. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996-2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 201-209.
4. NCCLS (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – English Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
5. NCCLS (2004) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14 (ISBN 1-56238-516-X). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
6. Wisselink H.J., Veldman K.T., Van den Eede C., Salmon S.A., Mevius D.J. (2006). Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobials agents licensed in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*, 113, 73-82.
7. Vela A.I., Moreno M.A., Cebolla J.A., González S., Latre M.V., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. (2005). Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Vet. Microbiol.*, 105(2):143-7.