

INDAGINE SULLA PRESENZA, PREVALENZA, TIPOLOGIA, MANIFESTAZIONI CLINICHE E ANTIBIOTICO SENSIBILITÀ DI STREPTOCOCCUS SUIS IN UNA FILIERA PRODUTTIVA NEGLI ANNI 2010-2018

SURVEY ON PRESENCE, PREVALENCE, SEROTYPE, CLINICAL EVIDENCE AND AB SENSITIVITY OF STREPTOCOCCUS SUIS IN A LARGE PIG PRODUCTION SYSTEM IN YEARS 2010-2018

SANDRI G.¹, GIOVANARDI D.², PESENTE P.², ROSSI G.², NIERO G.²

¹Soc. Agr. La Pellegrina Spa/Gruppo Veronesi; ²Laboratorio Tre Valli/Gruppo Veronesi

Parole chiave: *Streptococcus suis*, tipo capsulare, fattori di virulenza, multiplex PCR, antibioticosensibilità

Key words: *Streptococcus suis*, capsular type, virulence factors, multiplex PCR, antimicrobial sensitivity

RIASSUNTO: *Streptococcus suis* è uno dei patogeni batterici che più frequentemente induce forme cliniche nella fase del post svezzamento. Sebbene ampiamente diffuso e presente al livello mondiale con oltre trenta sierotipi diversi, solo alcuni sierotipi sono responsabili di forme cliniche quali meningite, setticemia e artrite. Per evidenziare se e quali fossero i sierotipi presenti all'interno delle filiere di un sistema di produzione integrato è stato fatto uno studio della durata di nove anni che ha catalogato e messo in correlazione origine dei casi, quadri clinici, risultati batteriologici, presenza di fattori di virulenza e sensibilità agli antimicrobici. Dall'analisi dei dati raccolti emerge che il tipo capsulare nella maggior parte dei casi non risulta essere tipizzabile con gli strumenti e le tecniche a disposizione. Tra quelli tipizzati quello più frequentemente isolato è il tipo 9, seguito dal tipo 2 seppur con una certa variabilità tra le fasi produttive. La maggior parte degli isolati ha mostrato un profilo Arc/mrp/Sly + o comunque ha confermato la presenza di uno o più fattori di virulenza. Non è invece stato possibile stabilire una correlazione univoca per sierotipo e/o patotipo intra e inter filiera. Il monitoraggio della sensibilità agli antibatterici negli ultimi 10 anni ha confermato come gli antibiotici betalattamici abbiano mantenuto nel tempo un ottimo livello di sensibilità confermandoli come molecole di prima scelta per un intervento terapeutico.

ABSTRACT: *Streptococcus suis* is definitely one of the most frequently isolated bacteria inducing severe clinical pictures in the post weaning stage. Although present worldwide with over 30 different serotypes, only few among these are able to induce clinical pictures like meningitis, septicemia and arthritis. In order to understand if and which were the serotypes possibly circulating in the different flows of a large integrated production system a study was carried over during a nine years long period correlating the origin of the isolates, the clinical pictures, bacteriology results, presence of virulence factors and antimicrobial sensitivity. Collected data confirm that in most of the cases it is impossible to determine the capsular type with the available tools/techniques. Among those classified the most frequent isolate is type 9 followed by type 2 though with quite some variation among stages. Most of the isolates showed a Arc/mrp/Sly + profile or anyhow confirmed the presence of at least one or more virulence factors. On the contrary it was impossible to establish a one way correlation with a certain serotype along a determinate flow or even among different flows.

Monitoring antimicrobial sensitivity during the last 10 years highlighted how betalactamic antibiotics maintained a very high sensitivity in time confirming these molecules as first choice for therapy.

INTRODUZIONE

Anche se *Streptococcus suis* può essere responsabile di problemi clinici durante tutta la vita produttiva del suino questo batterio è il patogeno più frequentemente isolato nei suinetti svezzati insieme a ETEC *E. coli*. A livello mondiale sono stati descritti/segnalati molti differenti tipi capsulari di *S. suis* ma solo un numero limitato di questi causano problemi clinici significativi. Lo scopo di questo studio è descrivere i risultati di un'indagine epidemiologica condotta nelle filiere di un grande sistema produttivo multisede italiano, durata nove anni, mostrando la distribuzione dei sierotipi e patotipi e cercando di evidenziare correlazioni tra sierotipo, fase produttiva e organo/materiale da cui veniva effettuato l'isolamento. Nell'ambito dello studio è stata anche analizzata l'evoluzione nel tempo del pattern dell'Antibiotico Sensibilità nei confronti di *Streptococcus suis*.

MATERIALI E METODI

Utilizzando un sistema di estrazione dati sono stati analizzati i risultati relativi agli isolamenti di *Streptococcus suis* effettuati dal Laboratorio Tre Valli nel periodo compreso tra il 2010 e il 2018. Di ogni conferimento da cui veniva isolato il patogeno veniva registrata l'età e la tipologia di soggetto (SCR-SV-INGR), gli organi o distretti anatomici/tessuti di isolamento, la eventuale compresenza di altri patogeni di natura batterica e/o virale. È stato inoltre possibile registrare l'origine (filiera di origine) dei suini per verificare se qualche sierotipo potesse prevalere all'interno di una specifica filiera. I visceri selezionati sono stati analizzati in piastre agar (Blood Agar Base, OXOID, Themofisher Scientific, UK) addizionate di sangue di montone al 3%. Dopo inoculo le piastre sono state incubate a 37 ± 1 °C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. Durante la lettura delle piastre di agar sangue, colonie sospette di *Streptococcus suis*, selezionate sulla base della loro morfologia e loro emolisi viridante (alpha- emolisi), sono state trapiantate su agar sangue per ulteriori analisi. Le colonie, con morfologia ed emolisi non tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a indagini biochimiche utilizzando la galleria miniaturizzata API Rapid ID 32 STREPT (bioMérieux, Francia). Le colonie che non presentavano profilo biochimico corrispondente a quello di *Streptococcus suis* sono state eliminate. Tra le colonie isolate, solamente quelle presentanti morfologia ed emolisi tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a test di sieroaagglutinazione rapida su vetrino utilizzando sei antisieri commerciali (Streptococcus suis type serum 1, 2, 4, 7, 9, 12 – SSI Diagnostica, Statens Serum Institute, Danimarca).

Per verificare la sensibilità antibiotica di *Streptococcus suis* le colonie isolate, con morfologia ed emolisi tipiche, sono state sottoposte ad antibiogramma, utilizzando il metodo Kirby-Bauer (metodo della diffusione su piastra) nei confronti di diversi principi attivi. Tra questi quelli più utilizzati sono Ampicillina (OXOID), Amoxicillina (OXOID), Amoxicillina + Ac. clavulanico (OXOID) e Ceftiofur (OXOID). Altri antibiotici, meno o non utilizzati per il trattamento specifico delle patologie da Streptococco, quali Trimethoprim-sulfametossazolo (OXOID), Lincomicina (OXOID), Florfenicolo (Merck), Enrofloxacin (Bayer) e Doxiciclina (OXOID) sono stati egualmente testati per verificare un'eventuale variazione di sensibilità nel tempo, seppur in un arco temporale più breve. Dopo inoculo di colonie isolate in Mueller-Hinton brodo (OXOID) e incubazione a 37 ± 1 °C per quattro ore in condizioni di aerobiosi, la sospensione batterica è stata diluita per raggiungere la torbidità di 0,5 McFarland. Con tale sospensione, sono state inoculate piastre di Mueller-

Hinton agar (OXOID) addizionate di sangue di montone al 3% ed incubate, in condizioni di aerobiosi, a 37 ± 1 °C per 4 ore. La valutazione degli aloni d'inibizione - così come la loro interpretazione (S-sensibile, I-intermedio, R-resistente) - è stata eseguita da lettore computerizzato SIRSCAN micro (I2A, Francia).

Alcuni degli isolati di *S. suis* sono anche stati analizzati in multiplex-PCR per la ricerca dei geni correlati alla produzione di fattori di virulenza. In particolare sono stati ricercati i geni codificanti i polisaccaridi della capsula *cps1* (per i sierotipi 1 e 14), *cps2* (per i sierotipi 2 e 1/2), *cps7* (per il sierotipo 7), *cps9* (per i sierotipi 9), i geni per la proteina EF e le sue varianti (*epf*, *epf**), i geni per la proteina suilisina (*sly*), i geni per la proteina MRP e le sue varianti (*mrp*, *mrp** and *mrp^s*), e il gene per la proteina arginina deaminasi (*arc*).

RISULTATI

Nel periodo preso in considerazione (2010-2018) *Streptococcus suis* è stato isolato in ben 910 occasioni da materiale (carcasse/organi/tessuti/tamponi) conferito al Laboratorio Tre Valli per un sospetto clinico riferibile al patogeno oggetto di studio o da "patologie miste". Tutti gli isolati (100%) sono stati sottoposti al test di antibiotico sensibilità. Per 746 isolati/isolamenti (82%) si è proceduto alla successiva sierotipizzazione. Solamente nel 6,8% dei casi (51/746) gli isolati selezionati sono stati sottoposti a multiplex PCR per confermare/smentire il sierotipo e individuare il patotipo.

Solo il 6,3% degli isolati proveniva da suinetti sotto-scrofa. Ben il 77,61% (579/746) degli isolati proveniva invece da Siti 2, ovvero da soggetti in fase post-svezzamento (età da 3-4 a 10-11 settimane di vita); questo a confermare come sia proprio questa la fase produttiva maggiormente colpita da questa patologia. I restanti conferimenti (120/746), pari al 16,08% , provenivano invece da soggetti in fase di magronaggio/ingrasso (Grafico 1).

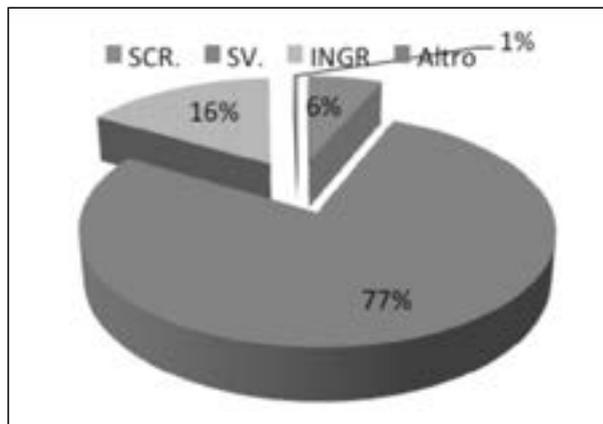


Grafico 1. Origine degli isolati/ Origin of isolates

Ben il 53% degli isolati sottoposti a un'indagine per determinare il sierotipo sono risultati non tipizzabili (NT) con i metodi a disposizione confermando così quanto ampia possa essere la gamma dei tipi capsulari presenti negli allevamenti italiani. Il tipo capsulare più rappresentato è il tipo 9 (22%), seguito a distanza dal tipo 2 (9%) e dal tipo 1-2 (8%). Gli altri sierotipi maggiormente isolati sono il tipo 7 (7%), il tipo 4 (6%) e il tipo 1 (5%). Sebbene non richiesta/ eseguita routinariamente la determinazione del patotipo ha confermato che quello più frequentemente isolato è il profilo Arc/mrp/Sly +.

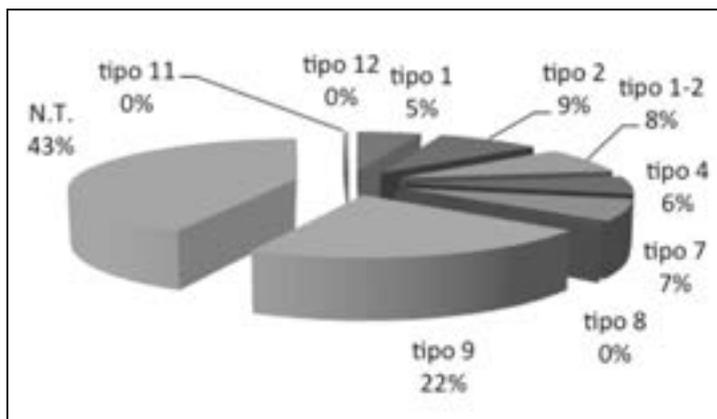


Grafico 2. Prevalenza sierotipi 2010-2018/Prevalence of serotypes 2010-2018

Nell'analisi della prevalenza dei sierotipi identificati nelle fasi sottoscrofa, svezzamento e ingrasso emergono piccole differenze che, sebbene non sottoposte ad analisi statistica, non sembrano essere significative. In tutte le tre fasi prevale l'insieme dei non tipizzabili (NT). Nei suinetti lattanti il tipo 1-2 e il tipo 1 sono i secondi e terzi maggiormente prevalenti. In svezzamento il secondo sierotipo maggiormente isolato è di gran lunga il tipo 9 col 26%. Seguono a distanza, con differenze percentuali minime tra di loro, i sierotipi 1-2, 2 e 7. Nella fase ingrasso, sempre dopo i NT, sono il tipo 2 (14%) e il tipo 4 (12%) quelli prevalenti. Al di là di quei ceppi così detti Non Tipizzabili (NT) – che abbiamo visto essere ampiamente prevalenti in tutte le fasi e quindi in praticamente tutte le filiere - non è stato invece possibile individuare un “sierotipo prevalente” all'interno di alcuna delle filiere considerate.

Il cervello è l'organo da cui *Streptococcus suis* è stato frequentemente isolato (181/746 conferimenti); in media nel 40,2% dei casi provenienti dallo svezzamento, nel 26,7% dei casi provenienti dalla sala parto e solo nel 3,3% dei casi provenienti dall'ingrasso. Nell'8,8% di questi 181 casi *Streptococcus suis* è stato isolato anche dalle articolazioni mentre nel 22% dei casi l'isolamento è stato multiorgano (cervello, visceri quali fegato e milza, polmoni) indicando un evidente fenomeno di setticemia. Negli ultimi anni è cresciuta la frequenza con cui *Streptococcus suis* è stato isolato dai polmoni. Infatti in ben 321 casi su 730 records (43,97%) è risultato essere il solo patogeno batterico isolato dall'apparato respiratorio. Spesso quello effettuato da polmoni è risultato essere l'unico isolamento (270/321 = 84,1%). La fase svezzamento è di gran lunga la fase produttiva da cui più spesso *S. suis* veniva isolato dal polmone.

In un'indagine limitata ai soli ultimi tre anni (2016-17-18) – che comunque comprende 460 conferimenti – PRRSV è il patogeno virale più frequentemente isolato assieme a *S.suis*. col 25% dei casi. Molto meno frequente il co-isolamento di *S.suis* e Influenza (SIV) verificatosi solo nel 4,3% dei casi mentre in ben tredici occasioni (2,8%) sono stati confermati in compresenza *S.suis*, PRRSV e SIV.

Per quanto riguarda il fenomeno della antibiotico resistenza, nei nove anni presi in considerazione da questa indagine, non si è riscontrato nessun aumento significativo nei confronti delle tipologie di principio attivo più frequentemente usate per trattare le infezioni da *Streptococcus suis*. Infatti Ampicillina, Amoxicillina e Amoxicillina+ Ac.Clavulanico hanno segnato percentuali di resistenza molto basse rispettivamente del 4,3%, 2,1% e 2,5%. Al contrario si è evidenziata un'elevata percentuale di resistenza nei confronti dell'associazione sulfamidico + trimethoprim (>80-90% resistenti).

DISCUSSIONE

Quella indotta da *Streptococcus suis* è senza dubbio la patologia più frequentemente riscontrata nella fase del post svezzamento. Forme di meningite e polmonite, associate o meno nelle forme setticemiche, sono le manifestazioni cliniche più comuni. E' invece molto difficile – se non impossibile – associare queste forme a un particolare tipo capsulare/sierotipo. Al contrario ci sentiamo di affermare che, tra le varie/possibili cause scatenanti, la presenza di “instabilità” da presenza di PRRSV è sicuramente quella più importante. In tema di antibiotico sensibilità è incoraggiante vedere come i principi attivi più comunemente e frequentemente utilizzati siano rimasti “attivi” nel tempo

CONCLUSIONI

Nonostante il sintomo clinico più frequentemente riportato sia la meningite, la grande maggioranza dei ceppi si è dimostrata in grado di essere molto invasiva essendo questi stati isolati da diversi organi/distretti. Negli ultimi anni *Streptococcus suis* sempre più spesso si è dimostrato essere un patogeno respiratorio di rilievo specialmente nella fase svezzamento e particolarmente quando accompagnato/scatenato da coinfezioni di natura virale quali quella da PRRSV e SIV. Poiché nel tempo sono stati isolati sierotipi diversi nelle stesse filiere ancora una volta non è stato possibile dimostrare una correlazione univoca tra la scrofaia (sito 1) di origine e i rispettivi siti 2 e siti 3 in termini di sierotipo. La presenza di molti ceppi per i quali non si è potuta definire una tipizzazione non è sicuramente fattore incoraggiante, tuttavia riteniamo importante proseguire il monitoraggio e la tipizzazione al fine di valutare il possibile, eventuale utilizzo di vaccini quali strumento di prevenzione. Per poter efficacemente trattare i soggetti colpiti è inoltre fondamentale proseguire il monitoraggio nel tempo della sensibilità di *S. suis* nei confronti degli antibatterici, ma gli antibiotici betalattamici possono ancora essere considerati di prima scelta in caso di necessità con fenomeni di resistenza molto limitati e sicuramente non in aumento negli anni.

BIBLIOGRAFIA

1. Higgins R., Gottschalk M. “Streptococcal Diseases” in Diseases of Swine 8th Edition, Iowa State University Press
2. Baums CG. (2013) “Pathogenesis, diagnosis and prophylaxis of *Streptococcus suis* diseases” in: 19th Swine & Wine Meeting, Hamm-Kump, Germany, 25-27 October 2013
3. Silva L.M., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., Valentin-Weigand P. ”Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR Vet Microbiol. 2006 Jun 15;115(1-3):117-27.
4. Varela N.P., Gadbois P., Thibault C., Gottschalk M., Dick P., Wilson J. “Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*” Anim Health Res Rev. 2013 Jun;14(1):68-77.
5. Sandri G. Giovanardi D., Pesente P., Rossi G. *Streptococcus suis* epidemiology (using serotyping and presence of virulence factors) and AMR (Antimicrobial Resistance) in a large pig production system in Italy. Proceedings of the 7th ESPHM Symposium Nantes, June, 2015
6. Also in XLI SIPAS Meeting – Montichiari (BS), Italy March 19-120 2015