

METICILLINO-RESISTENZA IN CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DI ORIGINE ALIMENTARE E ANIMALE

METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS IN FOOD AND ANIMAL

Traversa A.¹, Bianchi D.M.¹, Parlato C.², Fossati L.², Cavallerio P.², Domenis L.³, Spedicato R.³, Battisti A.⁴, Decastelli L.¹

(¹) NRL Stafilococchi coagulasi positivi, compreso *S. aureus*, Torino

(²) Ospedale San Giovanni Battista, Laboratorio di Microbiologia, Torino

(³) Centro di Referenza per le Malattie degli Animali Selvatici, IZS Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta, Sezione di Aosta

(⁴) Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, IZS Lazio e Toscana, Roma

SUMMARY

Some authors reported the possibility of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) human infections from meat and dairy products and methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolation in animals. The aim of this study is to investigate the methicillin-resistance in *S. aureus* strains and in *S. intermedius* strains (food and wild animals). 236 *S. aureus* strains from food, 36 *S. aureus* strains and 1 *S. intermedius* strain from wild animals were analyzed. 2 (0.74%) MRSA strains from bovine milk were phenotypically resistant to cefoxitin, grew on chromogenic medium (MRSA Brilliance Oxoid) and were *mecA* positive. All MRSA strains had the *spa*-type t899. All *mecA* positive strains showed at least resistance to eight of the antibiotics tested but none to glicopeptides. Both MRSA strains were enterotoxigenic.

Key words

MRSA, MRSI, dairy products, wild animals, *mecA* gene, *spa*-Typing

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus è comunemente isolato a livello cutaneo e nasofaringeo nel 30% della popolazione umana, senza causare malattia. Analogo comportamento possiede in campo veterinario *Staphylococcus intermedius*, presente nei carnivori domestici a livello delle giunzioni mucocutanee e nella cavità oronasale. Nei soggetti immunocompromessi, tuttavia, *S. aureus* è responsabile di gravi infezioni soprattutto a livello nosocomiale e l'acquisizione di proprietà di resistenza antibiotica ha contribuito ad aumentare la patogenicità di alcuni ceppi. L'acquisizione di infezioni da MRSA è generalmente di tipo ospedaliero (HA-MRSA), sono stati, tuttavia, isolati ceppi meticillino-resistenti in soggetti immunocompetenti non ospedalizzati e in piccole comunità chiuse (caserme, scuole, carceri e case di riposo); tale evento è definito "community-acquired MRSA" (CA-

MRSA). Alcuni autori sottolineano il rischio di una infezione anche per via alimentare (FBA-MRSA), in particolare modo nel settore suinicolo. Gruppi di ricercatori hanno riportato casi umani di infezione in soggetti a rischio (veterinari, allevatori) in contatto con suini, cavalli e cani. Tali isolamenti, a livello europeo, nei suini e in diverse specie animali hanno evidenziato la presenza del complesso clonale ST398 (1). La distinzione epidemiologica corrisponde a differenze genotipiche: il gene *mecA*, responsabile della meticillino-resistenza, è veicolato da un elemento genetico mobile integrato nel genoma batterico definito "staphylococcal cassette chromosome *mec*" (SCC-*mec*) che si presenta di tipo I, II e III negli HA-MRSA e di tipo IV e V nei CA-MRSA. Le infezioni "comunitarie" determinano frequentemente maggiore patogenicità e mortalità grazie alla produzione della leucocidina di Pantone Valentine (PVL) indotta dalla presenza del gene omonimo, che provoca ne-

croci tissutale a livello cutaneo e polmonare. La meticillino-resistenza nei CA-MRSA è generalmente crociata e limitata ai betalattamici e ai carbapenemi, mentre negli HA-MRSA si accompagna spesso a resistenza nei confronti di altri antibiotici.

La pubblicazione, inoltre, del parere EFSA (27 marzo 2009) (2) relativo alla valutazione del significato per la salute pubblica degli MRSA negli animali e negli alimenti rappresenta un valido strumento per affrontare tale problematica.

Recentemente in Europa si sono registrati isolamenti di *Staphylococcus intermedius* meticillino-resistente (MRSI) “*mecA* positivo” a partire da tamponi cutanei di cani e gatti. La trasmissione all’uomo da animali d’affezione è stata dimostrata in Olanda (3).

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti a ricerca di meticillino-resistenza 273 ceppi: 236 ceppi di *S. aureus* da alimenti di origine animale, 36 ceppi di *S. aureus* e 1 ceppo di *S. intermedius* da animali selvatici. I campionamenti sono stati effettuati nel periodo gennaio-agosto 2008 durante l’attività di Controllo Ufficiale sugli alimenti (grafico 1) e, per quanto riguarda i selvatici, nel periodo 2003–2009 presso il Centro di Riferenza per le Malattie degli Animali Selvatici (Ce.R.M.A.S) (grafico 2).

I ceppi isolati, identificati e stoccati in cryobank (Mast Diagnostic) a -18° C secondo le indicazioni fornite dalla Ditta produttrice, sono stati rivitalizzati mediante passaggio su piastra di agar sangue.

Allo scopo di valutare l’acquisizione di proprietà meticillino-resistenti si è proceduto alla semina su terreno cromogeno (MRSA Brilliance - Oxoid) e all’esecuzione del test di diffusione in Mueller-Hinton agar con dischetto di cefoxitina 30 g, secondo le linee guida del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI Gennaio 2008), utilizzando una sospensione batterica in acqua sterile pari a 0.5 McFarland. Il ceppo MRSA (ATCC 49775) è stato utilizzato quale controllo positivo.

I ceppi risultati “resistenti” sul terreno cromogeno (crescita di colonie tipiche) e al test di diffusione in agar (alone di inibizione ≤ 21 mm) sono stati sottoposti ad estrazione del DNA (Ultraclean microbial dna solution kit – MO BIO Laboratories) per la ricerca dei geni *mec* e *ccr* (determinazione della Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* o SCC-*mec*) secondo il protocollo operativo descritto da Zhang et al. (PCR Multiplex)(4).

I ceppi *mecA* positivi sono stati sottoposti alla ricerca dei geni codificanti la produzione della Leucocidina di Pantone Valentine tramite PCR end-point secondo il protocollo descritto da Lina et al. (5), al sequenziamento del gene *spa* (*spa*-typing) e alla determinazione del profilo di resistenza mediante *Microscan*.

RISULTATI

Tra i ceppi di *S. aureus* analizzati nel corso della ricerca, 8 (2.94%) sono cresciuti sul terreno cromogeno MRSA Brilliance; di questi solo 2 (0.74%) isolati da latte di massa bovino e da organi di suino sono ri-

Grafico 1: ceppi di *S. aureus* (n=236) da alimenti di origine animale

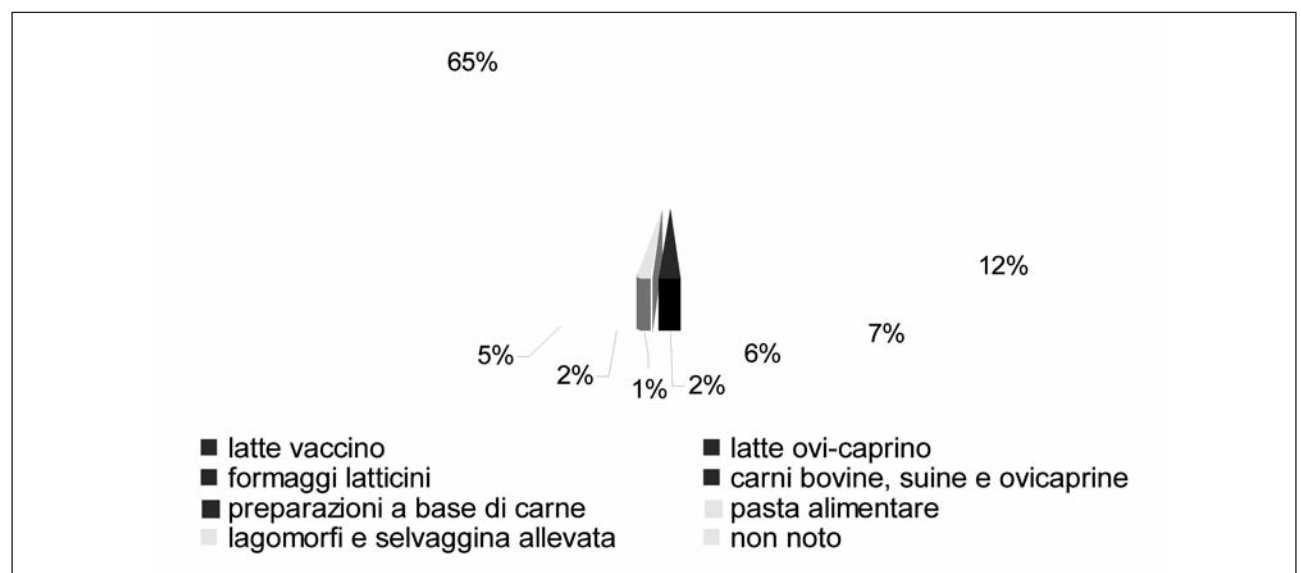
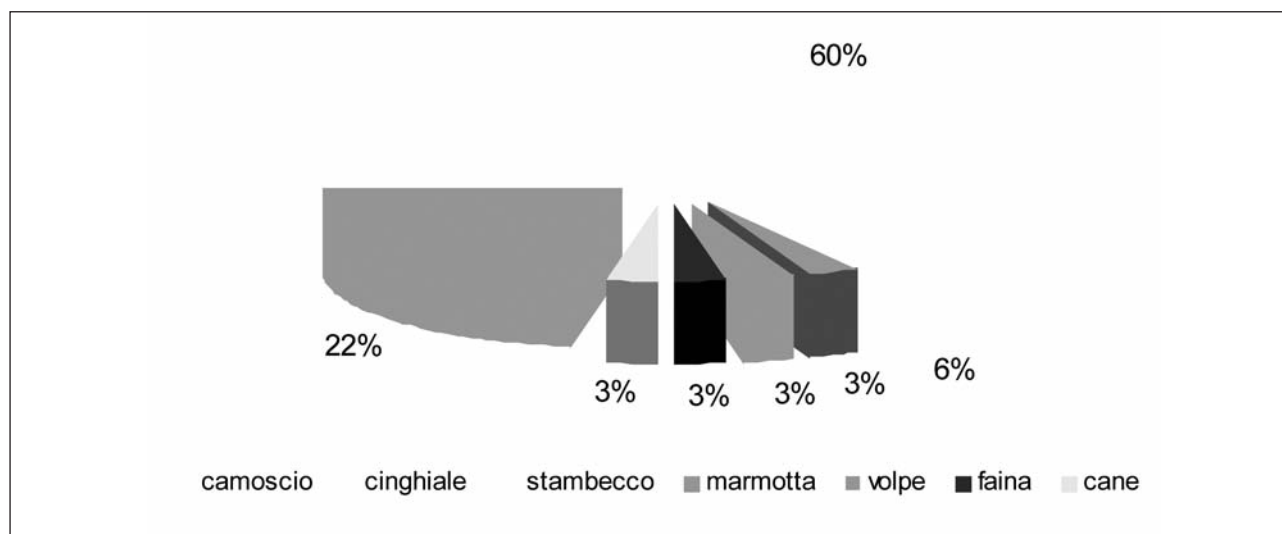


Grafico 2: ceppi di *S. aureus* (n=36) isolati da animali selvatici

sultati meticillino-resistenti al test della cefoxitina con presenza del gene *mecA* (cassetta cromosomica: SCC-*mec* di tipo IV e V; *spa*-type t899); la ricerca della leucocidina di Panton Valentine è risultata negativa. I rimanenti 6 ceppi (2%) cresciuti sul terreno cromogeno sono però risultati meticillino-sensibili (PCR: assenza del gene *mecA*; *spa*-type t091).

Nel corso della ricerca è stato inoltre testato un ceppo di *S. intermedius* isolato da una volpe; tale ceppo non è cresciuto sul terreno cromogeno e si è dimostrato sensibile al test di diffusione in agar con cefoxitina.

I risultati ottenuti, relativi ai ceppi MRSA, sono sintetizzati nella tabella 1.

I ceppi *mecA*-positivi hanno manifestato multiresistenza nei confronti di almeno otto antibiotici tra quelli utilizzati, mentre sono risultati sensibili ai gli-

copeptidi. Entrambi i ceppi MRSA sono risultati resistenti a betalattamici, tetraciclina e clindamicina e sensibili ai chinoloni, gentamicina e cloramfenicolo; il ceppo isolato da latte bovino ha presentato resistenza anche nei confronti di claritromicina, eritromicina e trimetoprim/sulfadiazina (tabella 2).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La crescita su terreno cromogeno ha evidenziato 6 positivi in più rispetto al test di diffusione in agar con cefoxitina (Se 99.9%; Sp 97.8%) e difficoltà nella definizione di "resistente". Tale dicitura, legata alla crescita di colonie color "blue denim", si è rivelata talvolta difficilmente interpretabile per la presenza di colonie con tonalità di colore differenti risultate

Tabella 1: caratteristiche biochimiche e biomolecolari dei ceppi MRSA

Specie	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
Matrice	organi suino	latte di massa vaccino
Enterotossina	POS	POS
MRSA Brilliance Oxoid	POS	POS
Test di diffusione in agar con Cefoxitina	13 mm	14 mm
Mic Oxacillina	> 2 µg/ml	> 2 µg/ml
PCR <i>mecA</i>	POS	POS
SCC- <i>mec</i>	tipo V	tipo IV
Leucocidina PV	NEG	NEG
<i>spa</i> -typing	t899	t899

Tabella 2: Profili di resistenza dei ceppi *mecA* +

	<i>S. aureus</i> da organi di suino	<i>S. aureus</i> da latte bovino
Penicillina	R	R
Ampicillina	R	R
Amoxicillina / Acido clavulanico	R	R
Oxacillina	R	R
Cefalotina	R	R
Cefuroxime	R	R
Teicoplanina e Vancomicina	S	S
Gentamicina	S	S
Eritromicina	S	R
Claritromicina	S	R
Tetraciclina	R	R
Ciprofloxacina	S	S
Levofloxacina	S	S
Ofloxacina	S	S
Clindamicina	R	R
Cloramfenicolo	S	S
Trimetoprim / Sulfadiazina	S	R

sensibili al test di diffusione in agar.

La percentuale di MRSA riscontrata (0.74%) ricomprende i risultati ottenuti in altri studi che riportano valori intorno al 3.75% da latte vaccino e formaggi latticini (6) e allo 0.5% da carne di pollo (7). La possibile sottostima può essere dovuta alla ricerca del gene *mecA* sui ceppi risultati resistenti al test di diffusione su agar: alcuni autori riportano la possibilità che ceppi *mecA*-positivi possano dimostrarsi fenotipicamente sensibili ai betalattamici. Tale proprietà può essere spiegata dalla “eteroresistenza” dei ceppi, la capacità di alcuni cloni batterici di esprimere fenotipicamente la resistenza (6).

Due ceppi MRSA isolati da latte bovino e da organi di suino presentano, rispettivamente, una cassetta cromosomica di tipo IV e di tipo V e *spa*-type t899; tale riscontro appoggia l'ipotesi che possa trattarsi di ceppi MRSA “comunitari” di origine animale. Prendendo in considerazione i dati bibliografici disponibili, ceppi con *spa*-type t899 isolati da carne suina, di pollo, tacchino e faraona, sottoposti a MLST (multilocus sequence type), risultano appartenere al Sequence Type 398 (7). Secondo il gruppo scientifico di esperti sui pericoli biologici dell'EFSA (BIOHAZ) i dati ottenuti mediante *spa*-typing possiedono ampia congruenza con i risultati del metodo MLST e di altre tecniche di tipizzazione (2). Si può presupporre che i due ceppi riscontrati possano essere ricondotti al sopraccitato complesso clonale.

Ceppi MRSA con SCC-*mec* di tipo IV e V presen-

tano nell'uomo un profilo di resistenza circoscritto ai betalattamici. I due ceppi MRSA evidenziati nello studio manifestano resistenza nei confronti di altre classi di antibiotici; tale rilievo induce a riflettere sul ruolo e sulla gestione degli antibiotici in stalla, forse troppo utilizzati come ausilio terapeutico e come promotori di crescita.

L'assenza di isolamento di ceppi MRSA da animali selvatici offre una nota ottimistica al panorama medico e veterinario.

Secondo il parere EFSA del 27 marzo 2009 i ceppi MRSA possiedono comunemente i geni che codificano la produzione delle enterotossine: a oggi è stato registrato un solo caso di intossicazione alimentare. Parimenti non vi è evidenza che il rischio di infezione sia maggiore a seguito di contatto o consumo di alimenti contaminati da ceppi MRSA (compreso il Sequence Type 398). Il consumo e la manipolazione di alimenti contaminati sono da considerare potenziali veicoli di trasmissione di MRSA. Viene quindi raccomandato lo sviluppo di un sistema di sorveglianza e monitoraggio nell'uomo e negli alimenti al fine di valutare l'andamento della diffusione ed evoluzione dei ceppi MRSA di origine animale (2).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Huijdens X.W., van Dijke B.J., Spalburg E., van Santen-Verheuevel M.G., Heck M.E., Pluister G.N., Voss A., Wannet W.J., de Neeling A.J. (2006) "Community-acquired MRSA and pig-farming" *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* . Nov 10 5:26;
- 2) European Food Safety Authority (2009) "Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods" *The EFSA Journal* 993, 1-73;
- 3) van Duijkeren E., Houwers D.J., Schoormans A., Broekhuizen-Stins M.J., Ikawaty R., Fluit A.C., Wagenaar J.A. (2008) "Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals" *Veterinary Microbiology* Vol. 128, Issues 1-2, 1 April, p.213-215;
- 4) Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Louie T., Conly J.M. (2005) "Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*" *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43, No. 10, p. 5026-5033;
- 5) Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gauduchon V., Vandenesch F. Etienne J. (1999) "Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia" *Clinical Infectious Diseases* 29:1128–32;
- 6) Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V. (2007) "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy" *International Journal of Food Microbiology*, 117 219–222G;
- 7) de Boer E., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., Wit B., Huijdens X.W., de Neeling A.J., Bosch T., van Oosterom R.A.A., Vila A., Heuvelink A.E. (2009) "Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat" *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007.

Finanziamento Ricerca corrente 2007: "Isolamento e identificazione di *S.aureus* meticillino-resistente (CA-MRSA) negli alimenti e nell'uomo: problematica emergente in sanità pubblica"