

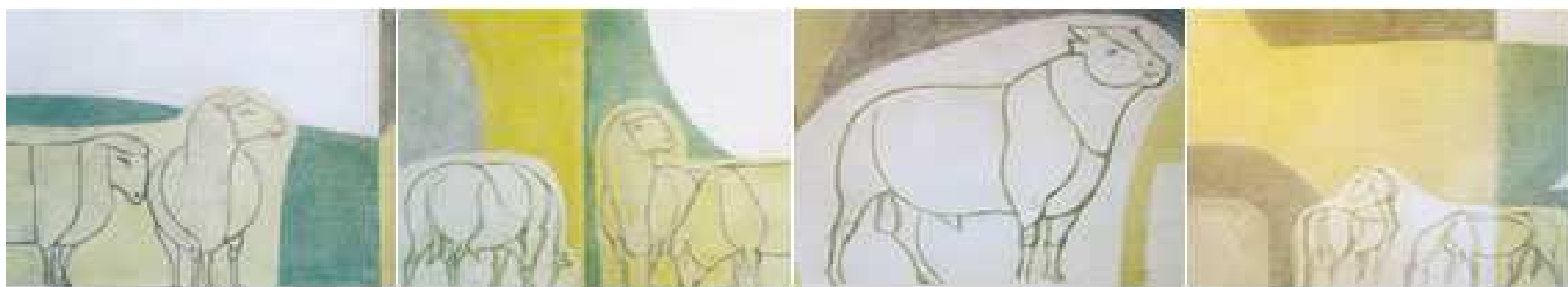
Ricerca Corrente LT1111

***Staphylococcus aureus e Staphylococcus aureus* meticillino resistente nella filiera lattiero-casearia appartenente alle principali specie lattifere**

Responsabile Scientifico : Giuseppina Giacinti

Unità operative impegnate nel progetto:

- a) U.O. 1. Responsabile Gilberto Giangolini
- b) U.O..2 Responsabile Alessia Franco
- c) U.O. 3 Responsabile Sandra Gradassi.



Introduzione

- ✓ ***S. aureus* principale agente di infezione intramammaria trasmissibile negli allevamenti da latte, con forte impatto sull'economia aziendale.**
- ✓ **Per la sua capacità enterotossica è una delle più importanti cause di tossinfezione alimentare (De Buyser et al., 2001).**
- ✓ **I soggetti con infezione intramammaria costituiscono il principale fattore di rischio di contaminazione del latte crudo e dei derivati (Vautor, 2003).**
- ✓ **Aumentata patogenicità di alcuni ceppi per acquisizione di meccanismi di antibiotico-resistenza, *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA).**



Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA): 1° isolamento 1961, fattori di rischio ambienti ospedalieri, resistenza a diverse classi di molecole oltre b-lattamici

Community-acquired MRSA (CA-MRSA) : a partire dagli anni novanta, si diffondono nelle persone non ospedalizzate, sensibilità verso antibiotici non b-lattamici,

Livestock-associated MRSA (LA-MRSA) : 1° isolamento mastite bovina anno 1972 (Devriese e Hommez, 1972). Aumento progressivo negli animali da reddito e da compagnia. Nel 2007 1° trasmissione di MRSA tra bovino e uomo (Juhasz-Kaszanyitzky et al, 2007).

Tre complessi clonali (CC)1, (CC) 398 e (CC) 97 MRSA diffusi nelle produzioni zootecniche italiane (Battisti et al., 2010, Franco et al., 2011, Alba et al., 2015, Carfora et al. 2016) la specie suina (Pan et al., 2009) principale reservoir per ceppi appartenenti al complesso clonale CC 398 il principale tra il Livestock Associated (LA-MRSA).



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

- ✓ **Dimostrato il rischio di trasmissione di MRSA all'uomo per contatto diretto con animali colonizzati da MRSA (Peton and Le Loir, 2014) soprattutto per alcune categorie professionali (allevatori e relativi familiari, personale di allevamenti, veterinari).**
- ✓ **Evidenziata la presenza di MRSA nella catena alimentare (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007; Carfora et al. 2015).**
- ✓ **Secondo il parere dell'EFSA, pur essendo basso il rischio di infezione per l'uomo tramite gli alimenti, assumere o maneggiare cibi contaminati può rappresentare un possibile veicolo di trasmissione di MRSA (The EFSA Journal, 2009a).**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Obiettivi:

- ✓ indagine sulla diffusione di MSSA e MRSA negli allevamenti ovini e bovini da latte;
- ✓ studio del livello di prevalenza di MSSA e MRSA intra-allevamento;
- ✓ caratterizzazione di tipo fenotipo e genotipico e fattori di patogenicità di MSSA e MRSA;
- ✓ stesura di protocolli d'intervento da applicare a livello di produzione primaria per la riduzione e il contenimento dell'infezione da MSSA ed eradicazione dell'infezione da MRSA;
- ✓ predisposizione di piani di monitoraggio e sorveglianza per valutare presenza e trend di diffusione di MRSA negli allevamenti da latte;



Materiali e metodi (1)

Piano di campionamento e tipologia di campioni

- ❖ **Periodo dello studio: 2011-2012**
- ❖ **Allevamenti esaminati: 505 bovini e 286 ovini**
- ❖ **Tipologia di campioni:** latte di massa prelevato da Cooperative di Produttori e/o Caseifici nell'ambito dei controlli di routine per il pagamento latte secondo qualità.



Materiali e metodi (1) *Piano di campionamento e tipologia di campioni*

Prov.	Totale Az. (*)	N° bovini da latte	Consistenza media	Aziende monitorate	% Aziende monitorate
FR	213	8021	38	73	34,27
LT	269	19628	73	117	43,49
RI	140	8731	63	67	47,86
RM	292	35868	123	195	66,78
VT	110	10214	94	53	48,18
Totale	1020	82462	81	505	49,51

Provincia	Tot. Az. (*)	N° ovini	Aziende monitorate	% Aziende monitorate
FR	384	48201	9	2,3
LT	131	26698	15	11,4
RI	210	34702	19	9,1
RM	517	220157	144	27,8
VT	762	306728	99	12,9
Tot	2004	636486	286	14,3

(*) aziende con un numero di animali ≥ 10

Materiali e metodi (1)

Piano di campionamento e tipologia di campioni

❖ Allevamenti selezionati per prevalenza infezione intra-allevamento periodo 2011-2014

✓ 87 allevamenti bovini di cui 10 positivi a MRSA

✓ 22 allevamenti ovini di cui 1 positivo a MRSA

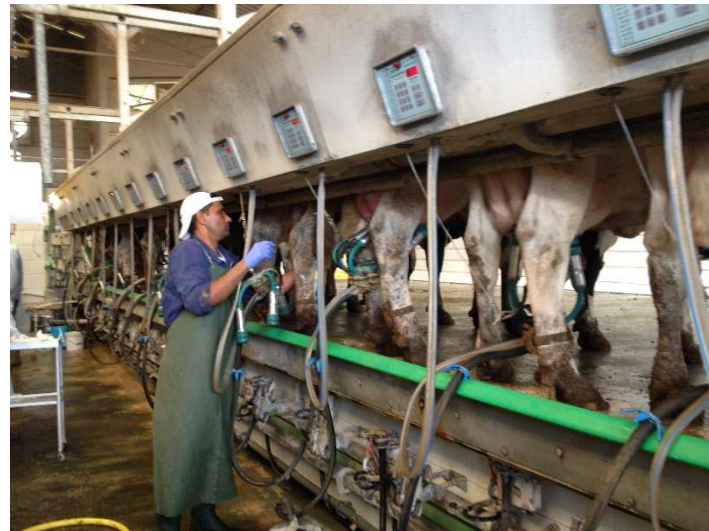
❑ In 8 allevamenti MRSA (7 bov 1 ov.) eseguiti:

- tamponi ambientali (n°8)
- tamponi cutanei e nasali in animali (n°22)
- tamponi naso-faringei umani auto-prelevati (n°24)





- 87 allevamenti risultati positivi a *S.aureus* nel latte di massa
- consistenza media 94 bovini in lattazione (min 6 max 1492)
- 7677 animali monitorati



Tipologia di campioni:

- pool dei 4/4 (latte individuale) di tutti i soggetti in lattazione
- campione di latte di massa rappresentativo dell'intera mungitura (per stima predittiva)

Materiali e metodi (1)

Allevamenti bovini selezionati per indagine intra-allevamento

Provincia	N° aziende	N° bovine lattazione	Consistenza media (min-max)
FR	8	430	53,7 (6-267)
LT	14	902	64,4 (38-184)
RI	6	359	59,8 (29-90)
RM	50	4940	98,8 (11-1492)
VT	9	1046	116,2 (18-279)
Tot	87	7677	94 (6-1492)



Allevamento	N° bovine in lattazione	T.O.F. umani
cod 4 (RM)	43	nd
cod 5 (RM)	86	nd
cod 6 (RM)	22	2
cod 9 (RM)	88	2
cod 10 (VT)	166	nd
cod 11 (RM)	111	2
cod 12 (LT)	70	4
cod 13 (RM)	98	nd
cod 14 (FR)	34	2
cod 16 (VT)	228	3
Tot: 10	946	15



- 22 allevamenti risultati positivi a *S.aureus* nel latte di massa
- consistenza media 298 ovini in lattazione (min 57 max 556)
- 6555 animali monitorati



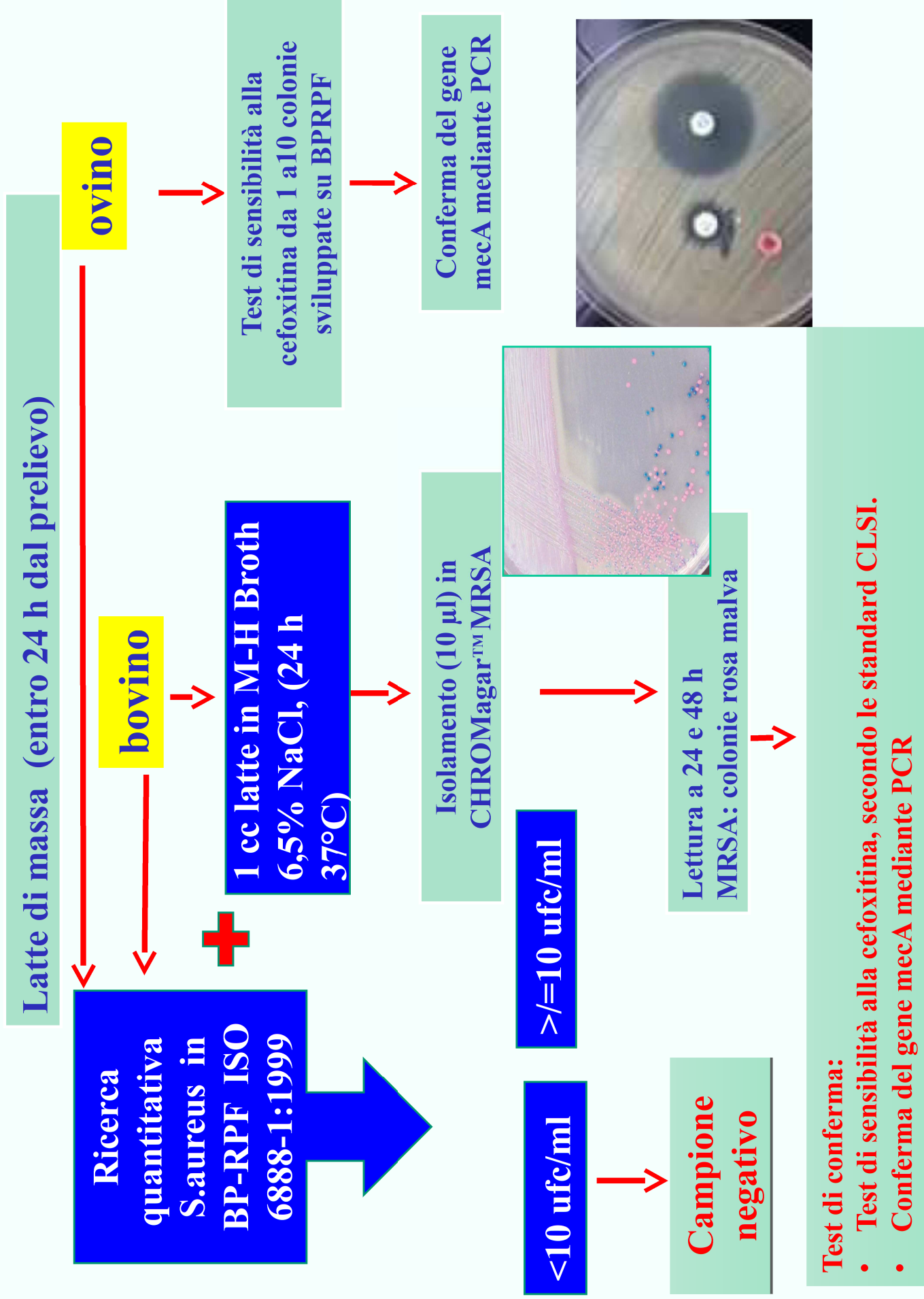
Tipologia di campioni:

- Campione del pool delle due emimammelle (latte individuale) di tutti i soggetti in lattazione
- campione di latte di massa rappresentativo dell'intera mungitura (per stima predittiva)

Provincia	N° aziende	N° pecore lattazione	Consistenza media
FR	2	211	105
RI	1	94	94
RM	15	4961	331
VT	4	1289	322
Tot	22	6555	298 (57-556)



Allevamento	N° pecore lattazione	T.O.F. umani	T.O.F./cutanei animali
cod 1 (RM)	556	9	5



MATERIALI E METODI (2)

✓ *Latte individuale di aziende negative a MRSA* :

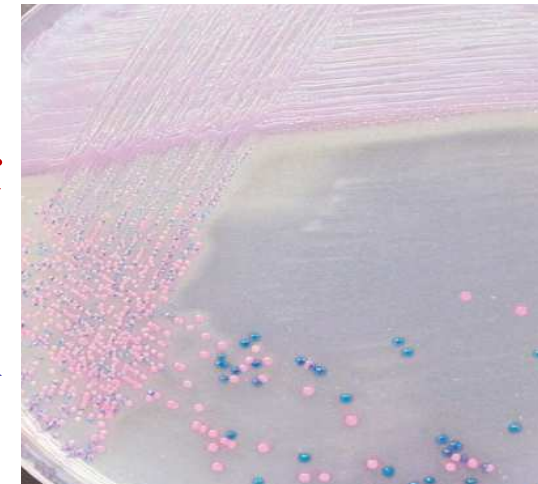
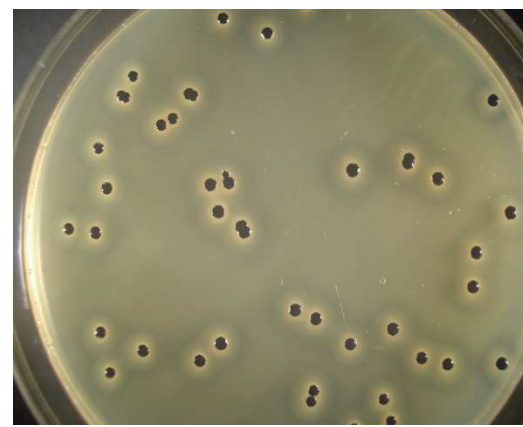
- ricerca qualitativa di *S.aureus* con BP-RPF

✓ *Latte individuale di aziende positive MRSA* :

- ricerca qualitativa di *S.aureus* con BP-RPF
- Ricerca qualitativa di MRSA con CHROMagar™ MRSA

✓ *Tamponi ambientali, nasali degli animali e oro-faringei umani:*

- Arricchimento selettivo in MH Broth al 6,5% di NaCl x 24 h 37°C
- Semina per isolamento su BP-RPF e CHROMagar™ MRSA



MATERIALI E METODI (2)

Su un sub set di isolati MSSA e tutti gli MRSA sono state eseguite caratterizzazioni fenotipiche e genotipiche

- **Rivelamento dei geni codificanti Ses/Sels (EU-RL CPS) e ricerca fenotipica delle enterotossine, SEA-SED, (set RPLA)**
- **Test di sensibilità agli antibiotici mediante diffusione in agar (CLSI). Molecole testate: ampicillina, amoxicillina/acido clavulanico, cefotaxime, tetraciclina, sulfonamide, cloramfenicolo, gentamicina, trimethoprim/sulfamethoxazolo, clindamicina, enrofloxacin, eritromicina, cefalotina, kanamicina**
- **Rilevamento della produzione di slime (Congo Red Agar – Arciola et al. 2002) e dei geni ICA e Bap (Arciola et al. 2001)**

MATERIALI E METODI (2)

➤ Classificazione biomolecolare:

- **spa typing,**
- **Multilocus sequence typing (MLST)**
- **Classificazione del complesso Staphylococcal Cassette Chromosome mec, SCCmec (SCCmec)**
- **Raggruppamento in Complessi Clonali (Clonal Complex, CC), oppure in Sequence Type (ST) dedotto sulla base delle informazioni circa l'associazione tra spa type e ST circolanti in Italia detenute presso il CRN-AR (incluse le informazioni già pubblicate in letteratura)**

Risultati- bovino

Prov.	Neg	MSSA	MRSA
FR	33	38	2
LT	61	55	1
RI	37	27	3
RM	99	88	8
VT	31	19	3
Totale	<u>261</u>	<u>227</u>	<u>17</u>

% allevamenti bovini positivi
a *S. aureus* 48,32 (244/505)

% allevamenti positivi a MRSA
3,37% (17/505)
6,97 (17/244)

Tab. 1: aziende positive a MSSA e MRSA divise per provincia

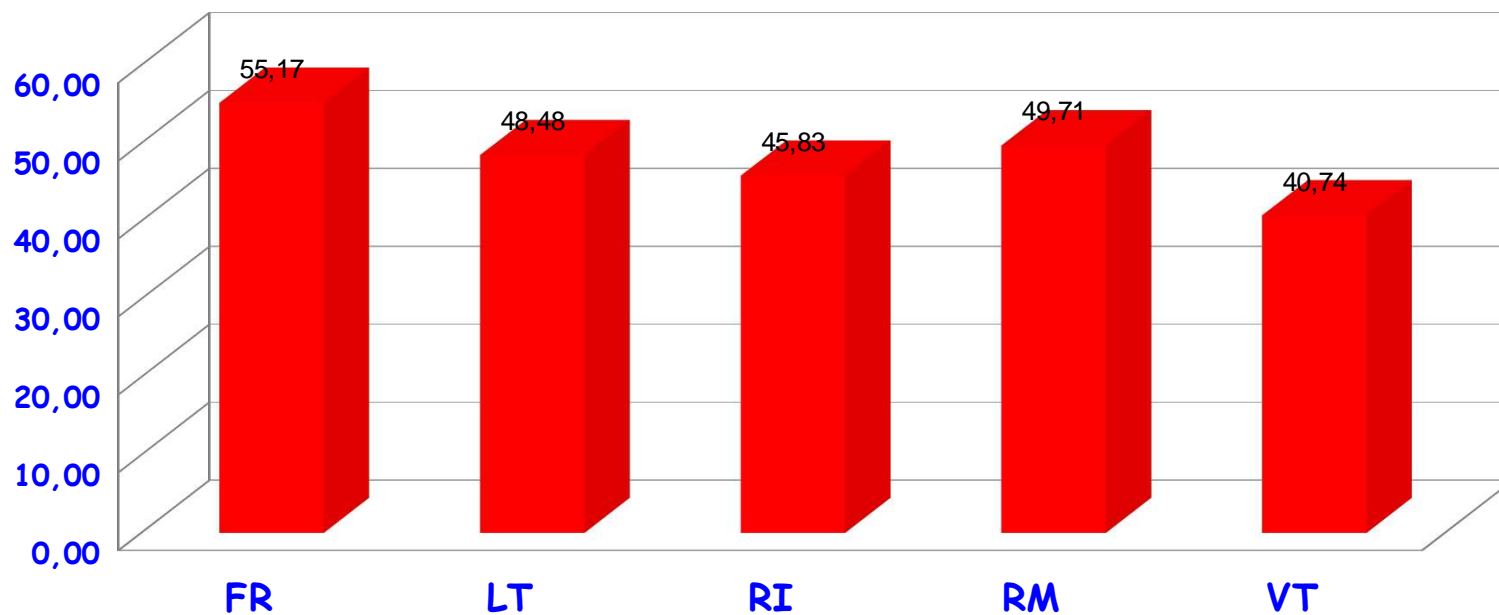


Fig. 1: % aziende positive a *S.aureus* divise per provincia

ufc/ml di <i>S.aureus</i>	N°aziende positive a <i>S.aureus</i>	N°aziende positive a MRSA	% pos
10 -50	68	0	27.86
50-200	62	5	25.41
201-500	49	6	20.08
501-1000	42	5	17.21
>1000	23	1	9.43
Totale	244	17	

Tabella 1. Distribuzione delle aziende positive a MRSA e MSSA in funzione delle ufc/ml di *S.aureus*

MRSA	t127 ST (CC)1	t011 CC398	t2953 CC1	t359 CC97
	13	2	1	1
	76,5%	11,8%	5,9%	5,9%

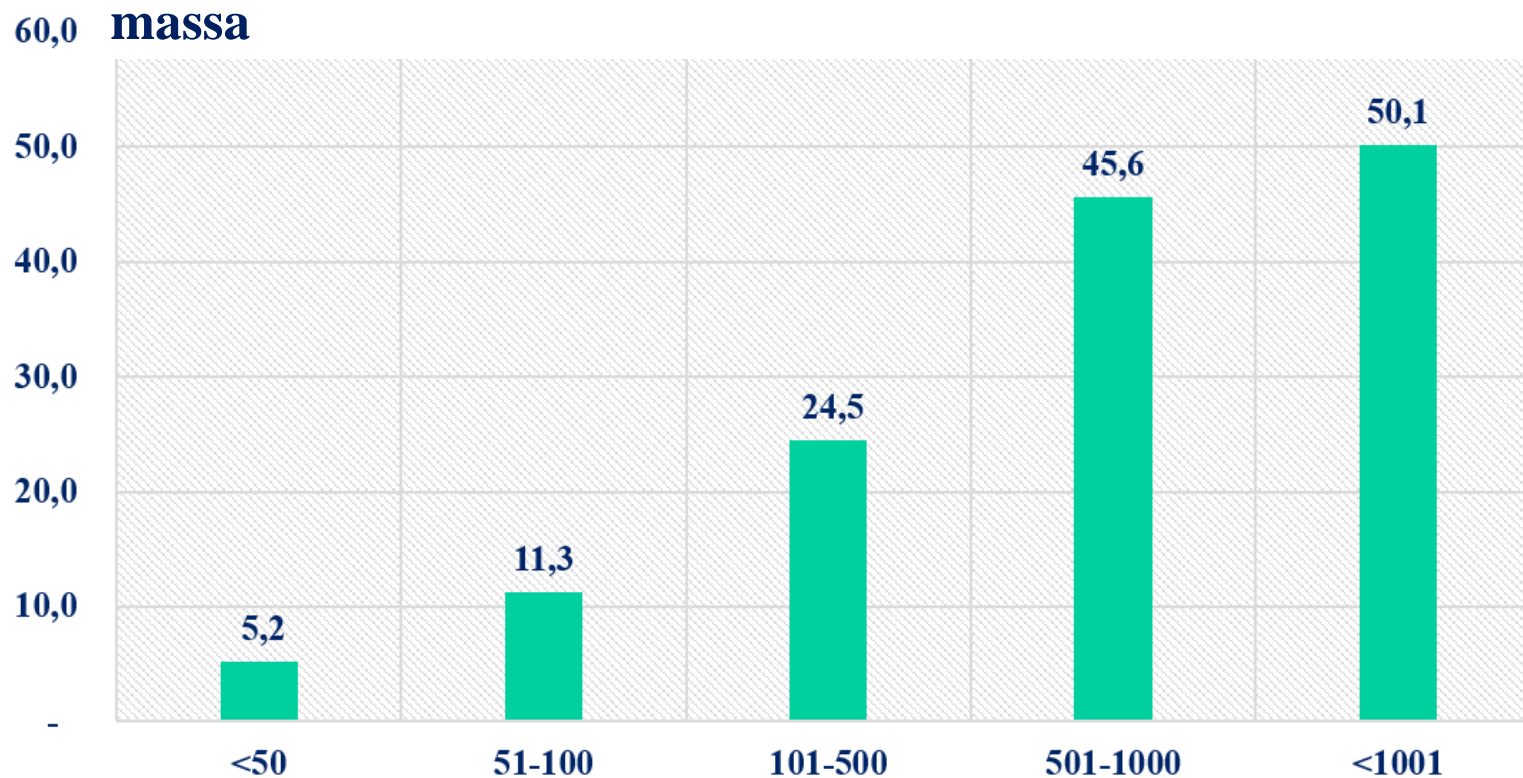
**Risultati: prevalenza MSSA e MRSA
intrallevamento**

N° allev	Sogg. controllati	Sogg. pos a S. aureus	% media infezione	range
n°87	n°7677	n°1704	32,93%	0,9-100%

Percentuale media d’infezione da S.aureus intra-allevamento (bovino) e media delle ufc/ml risultate dal latte di massa

Allevamenti (n°)	Consistenza media	Prevalenza sul totale (%)	Prevalenza media infezione (%)	ufc/ml medie latte di massa
8	99	9,2	<5	21
13	65	14,9	5_10	54
22	102	25,3	10_30	379
21	70	24,1	30_50	953
23	128	26,4	>50	1697
Tot 87			32,93	792

Prevalenza media infezione per classi di ufc/ml nel latte di massa



ufc/ml massa	<50	51-100	101-500	>501
Stima infezione	Bassa	Media	Alta	Molto alta

Risultati: allevamenti positivi a MRSA

N°allev.	N°bov.	MSSA	MRSA	MSSA +MRSA	Latte Massa
10	946	165 (17.4%)	56 (5.9)	221 (23.4)	Pos MSSA/MRSA

Tasso medio d'infezione da *S. aureus* 23.4% range 2.70 e il 60%

Tasso medio d'infezione da MRSA 5.9% range 0.90 e il 39.5%

25.3% di MRSA tra S.aureus

Allev.	Bov. Latt.ne	% <i>S. aureus</i>	% MRSA	spa-type MRSA	
				Latte	T.O.F. Operatore
4	43	44%	39,5%	t011; t127; t9295	nd
5	86	5,8%	3,5%	t127	nd
6	21	<u>14,3%</u>	<u>14,3%</u>	t127; t091	t127
9	88	9,1%	5,7%	in corso	t3841
10	166	56,1%	1,2%	t011	nd
11	111	2,7%	0,9%	t2953	neg
12	70	60%	12,1%	t127; t2953	t127
13	98	6,1%	4,1%	t011	nd
14	34	<u>8,8%</u>	<u>8,8%</u>	t127 ; t011; t091	t011
16	228	17,1%	2,6%	t127	t127

- spa-type t127 ST (CC) 1 più frequentemente osservato tra gli allevamenti (6/9) seguito da t011 ST (CC) 398 (4/9)
- In 4 su 9 allevamenti identificati MRSA appartenenti ad un singolo *spa-type*
- Nei restanti 5 rilevata contemporanea presenza di più *spa types*
- MRSA isolati dagli operatori (az. n°: 6; 12; 14; 16) risultati appartenere allo stesso complesso clonale e *spa-type* riscontrato nelle bovine presenti nei corrispondenti allevamenti.

RISULTATI - Ovino

% allevamenti positivi a *S. aureus*
53,49% (153/286)

% allevamenti positivi a MRSA
0,69% (2/286)

Prov.	Tot. Az.	MSSA	MRSA	% az.pos
FR	9	2		22%
LT	15	14		93%
RI	19	14		73%
RM	144	86	+ 1 <i>mecA</i>	60%
VT	99	36	+ 1 <i>mecC</i>	36%
Totale	<u>286</u>	<u>151</u>	<u>2</u>	<u>53,4%</u>

1 MRSA (*mecA*) *spa*-type t127 ST (CC) 1

1 MRSA (*mecC*) *spa* type t843, ST(CC)130

Contenuto medio: $3,31 \times 10^2$ UFC

Range di concentrazione: 10^1 e 10^4

UFC

UFC	N° campioni positivi	% campioni positivi
<100	29	18,9
$\geq 100 < 500$	63 + 1MRSA (mecC)	41,8
$\geq 500 < 1000$	19	12,4
$\geq 1000 < 2000$	15+1 MRSA (mecA)	10,5
$\geq 2000 < 10000$	22	14,4
≥ 10000	3	2

distribuzione dei campioni positivi a S. aureus in classi di UFC

Risultati: prevalenza MSSA e MRSA in allevamento

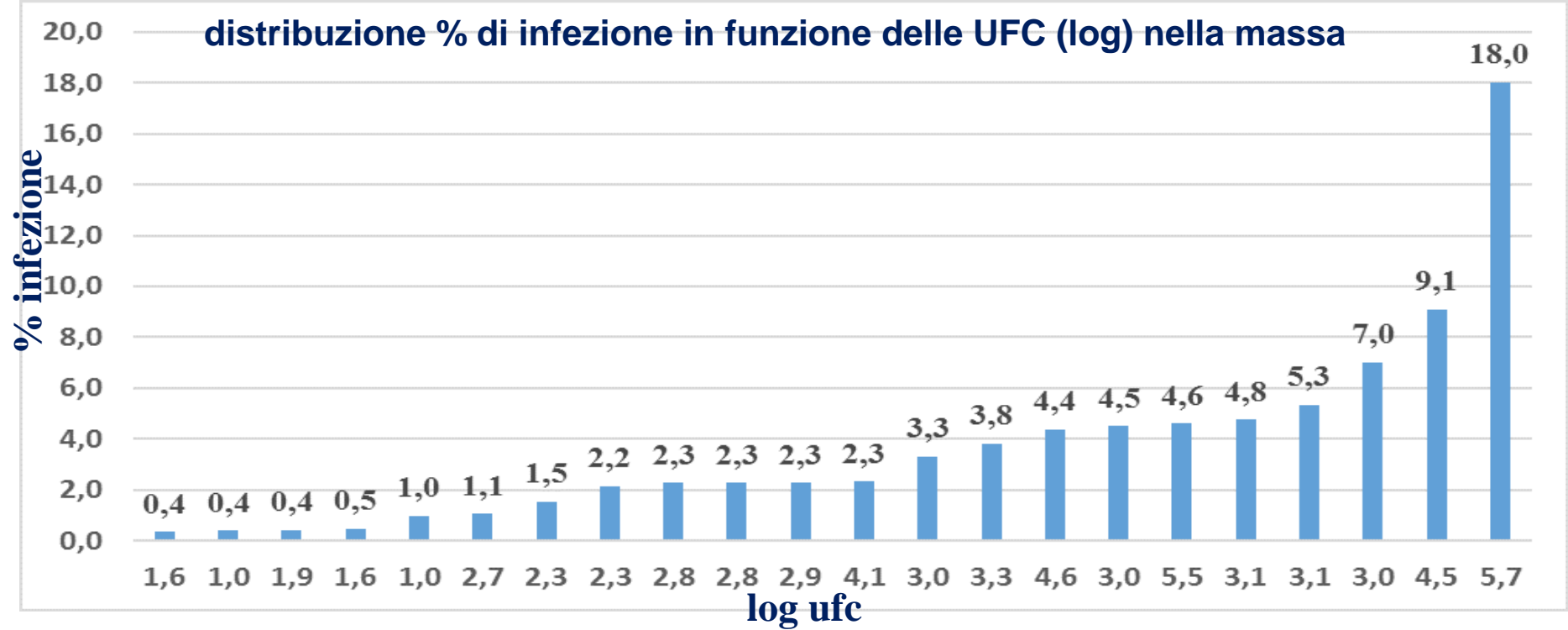
N° allev	Sogg. controllati	Sogg. pos a S. aureus	% media infezione	range
n°22	n°6555	n°252	3,84%	0,4-20,1%

Latte di massa:

Contenuto medio $1,5 \times 10^3$ UFC

Range di concentrazione: 1×10^1 e $5,4 \times 10^4$ UFC

RISULTATI



	% media infezioni in relazione alle classi di ufc (log)				
	0,5	1,9	4,8	5,3	11,3
Log ufc	<2	≥2 <3	≥3 <4	≥4 <5	≥5

Risultati: allevamento positivo a MRSA

Allev.	Ovini Latt.ne	<i>S. aureus</i>	MRSA	spa-type MRSA		
				Latte ind/massa	T.O.F. e cutanei animali	T.O.F. Operatore
1	556	12 (2,16%)	2 (0,34%)	t127	t127	t127

Nel latte di massa la concentrazione di *S. aureus* è stata di 5×10^3 ufc/ml, ed è stata identificata la copresenza di MRSA e MSSA

Tutti gli MRSA isolati dagli animali e dall'uomo sono risultati appartenere allo stesso complesso clonale e *spa*-type

spa type t127, sequence type ST1, clonal complex CC1, SCC_{mec} type Iva

Conclusioni

- ✓ Elevata diffusione di *S. aureus* negli allevamenti bovini della Regione Lazio, bassa la diffusione di MRSA.
- ✓ A livello di allevamento, elevata prevalenza d'infezione da MSSA mentre contenuta da MRSA.
- ✓ Tra gli isolati MRSA evidenziata una maggiore frequenza di *spa* type t127 ST(CC)1, confermandolo come principale *lineage* nelle produzioni zootecniche italiane.
- ✓ La contemporanea presenza dello stesso *lineage* in campioni animali e umani suggerisce una avvenuta trasmissione di MRSA tra animale e uomo o viceversa.
- ✓ La contemporanea presenza di isolati appartenenti a diversi *spa* types rilevata in alcuni allevamenti, potrebbe favorire lo scambio e la diffusione di determinanti per la virulenza tra diversi *lineages* di MRSA.

Conclusioni

- ✓ Elevata diffusione di *S. aureus* negli allevamenti ovini della Regione Lazio, bassa di MRSA.
- ✓ Contenuta la prevalenza d'infezione a livello di allevamento.
- ✓ Isolato di MRSA (*spa* type t127 ST(CC)1) risultato contemporaneamente presente in campioni animali ed umani, suggerendo un'avvenuta trasmissione di MRSA tra animale e uomo o viceversa.
- ✓ Primo caso in Italia di isolamento di *S. aureus* mecC. Lineage osservato in diversi paesi europei e riscontrato in differenti specie animali e uomo, capacità di adattamento.

Conclusioni

- ✓ Elevata sensibilità del metodo colturale nel rilevamento di MSSA e MRSA
- ✓ Impiego del latte di massa come strumento predittivo circa il livello d'infezione della mandria/gregge. Maggiormente predittivo per bovino che ovino.
- ✓ Impiego del latte di massa come monitoraggio periodico circa la presenza e trend di diffusione di MRSA in allevamenti da latte.
- ✓ Importanza dell'applicazione di protocolli per il contenimento dell'infezione da MSSA (<5%) e eradicazione da MRSA .

Staphylococcus aureus nel latte di massa e di capezzolo in allevamenti ovini della regione Lazio.

G. Giacinti, D.Sagrafoli, G.Rosa, A.Tammaro, E.Bovi, C.Veschetti, S.Amatiste - SIPAOC 2012

IDENTIFICAZIONE DEL PROFILO ENTEROTOSSICO DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO SENSIBILE (MSSA) E STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO RESISTENTE (MRSA) ISOLATI DA LATTE BOVINO

G.Giacinti, D. Sagrafoli, A.Tammaro, E. Bovi, V. Carfora, N. Marri, S.Amatiste - SIDILV 2013

Methicillin-sensible Staphylococcus aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus isolated in raw milk from dairy sheep farms located in Central Italy
G. Giacinti, D. Sagrafoli, A. Tammaro, E. Bovi, N. Marri, G. Giangolini, V. Carfora, G. Cordaro, A. Ianzano, S. Lorenzetti, A. Caprioli, S. Amatiste. Femesprum 2015

International Dairy Journal

Volume 42, March 2015, Pages 12-15

Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products in Central Italy

V. Carfora [a](#), *, A. Caprioli [b](#), N. Marri [a](#), D. Sagrafoli [a](#), C. Boselli [a](#), G. Giacinti [a](#), G. Giangolini [a](#), L. Sorbara [b](#), S. Dottarelli [b](#), A. Battisti [b](#), S. Amatiste [a](#)

J Dairy Sci. 2016 Jun;99(6):4251-8. doi: 10.3168/jds.2016-10912. Epub 2016 Apr 6.

Methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study.

Carfora V¹, Giacinti G², Sagrafoli D², Marri N², Giangolini G², Alba P¹, Feltrin F¹, Sorbara L¹, Amoruso R¹, Caprioli A¹, Amatiste S², Battisti A (Basel). 2017 May; 9(5): 161.

Published online 2017 May 16. doi: [10.3390/toxins9050161](#) PMID: PMC5450709

Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the Ovine Dairy Chain and in Farm-Related Humans

Guerrino Macori,^{1,*} Giuseppina Giacinti,² Alberto Bellio,¹ Silvia Gallina,¹ Daniela Manila Bianchi,¹ Daniele Sagrafoli,² Nicla Marri,² Gilberto Giangolini,² Simonetta Amatiste,² and Lucia Decastelli¹

Characterization of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene isolated from raw sheep milk in Italy

G. Giacinti, V. Carfora, R. Amoruso, M. Iurescia, S. Sagrafoli, N. Marri, G. Giangolini, S. Amatiste, A. Franco, A. Caprioli, A. Battisti

Manuscript JDS-17-12940.R1 (IN PRESS)

Title: Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying *mecA* or *mecC* and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in dairy sheep farms in Central Italy.

G. Giacinti, V. Carfora, R. Amoruso, M. Iurescia, S. Sagrafoli, N. Marri, G. Giangolini, S. Amatiste, A. Franco, A. Caprioli, A. Battisti



Grazie per l'attenzione