



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE
DOTTORATO DI RICERCA IN SALUTE ANIMALE**

CICLO XXV

**CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DELLA
CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DI ALLEVAMENTO
E DELLA COLONIZZAZIONE DEI SUINI
DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO
RESISTENTE (MRSA)**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Paolo Martelli**

**Tutor:
Chiar.mo Prof. Paolo Martelli**

Candidato: Dr. Giuseppe Merialdi

INDICE

	PAG
INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1	2
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> meticillino resistente (MRSA)	2
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> e antibiotico resistenza	2
1.3 Classificazione di MRSA su base epidemiologica	5
1.4 Classificazione di MRSA su base biomolecolare	8
CAPITOLO 2	12
2.1 MRSA nell'allevamento suino	12
2.2 Situazione epidemiologica in Italia	19
2.3 MRSA ST 398 in persone di categorie a rischio	20
2.4 MRSA negli alimenti di origine animale	23
CAPITOLO 3 – PARTE SPERIMENTALE	29
3.1 Studio sulla contaminazione ambientale in allevamenti suini in relazione alla fase produttiva ed alla applicazione dei trattamenti di pulizia e sanificazione	29
3.2 Studio longitudinale sulla colonizzazione nasale e sulla contaminazione ambientale in un allevamento suino a ciclo chiuso	37
3.3 Studio sulla presenza di MRSA al macello e tipizzazione molecolare dei ceppi isolati in allevamento ed al macello	43
CONCLUSIONI	48
BIBLIOGRAFIA	50
ATTIVITÀ DI RICERCA E PUBBLICAZIONI	64

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus è un patogeno dell'uomo e degli animali che ha nel tempo sviluppato resistenze verso diverse classi di antibiotici. Sono definiti *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) i ceppi che hanno acquisito resistenza verso gli antibiotici β -lattamici, inclusa la meticillina. I ceppi di MRSA sono emersi a livello ospedaliero negli anni '70. Dagli anni '90 è stato osservato un sostanziale cambiamento nell'epidemiologia di MRSA, con la diffusione di ceppi multiresistenti anche in soggetti non ospedalizzati. Solo più recentemente alcune specie animali si sono dimostrate capaci di fungere da *reservoir* di MRSA e, potenzialmente, anche di poter trasmettere il batterio all'uomo. La prima segnalazione di colonizzazione nei suini con implicazione nelle infezioni umane è stata riportata da Voss et al., (2005) nei Paesi Bassi; successivamente, vi sono state segnalazioni anche in Francia, Danimarca, Germania e Singapore (Guardabassi et al., 2007; de Neeling et al., 2007; Sergio et al., 2007) e il contatto con i suini è stato identificato come importante fattore di rischio per la colonizzazione di MRSA nell'uomo (van Rijen et al., 2007). Studi recenti hanno inoltre documentato la trasmissione di MRSA tra suini ed operatori del settore suinicolo come veterinari, addetti agli allevamenti e loro famiglie (Voss et al., 2005; Pan et al., 2009). In Italia è stata evidenziata colonizzazione nasale da MRSA nel 38% delle partite di suini macellati con notevole eterogeneità dei cloni isolati (Battisti et al., 2010). Il potenziale ruolo dei prodotti alimentari nella diffusione di MRSA di origine animale è tuttora sconosciuto; alcuni lavori hanno comunque messo in evidenza la presenza di MRSA nella catena alimentare (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007). 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). Scopo del presente studio è stato di fornire un contributo alla conoscenza dell'epidemiologia di MRSA nell'allevamento suino in Italia, con particolare riferimento alla contaminazione ambientale ed alla colonizzazione nasale dei soggetti portatori, con l'intento di contribuire alla individuazione di strategie atte a ridurre l'incidenza.

CAPITOLO I

1.1 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA)

Gli stafilococchi (famiglia Staphylococcaceae, genere *Staphylococcus*) sono batteri di forma coccoide, immobili, asporigeni, Gram positivi e catalasi positivi approssimativamente di 1 μm di diametro, con una spessa parete di peptidoglicano. La temperatura di crescita è compresa tra i 18 e i 40°C con un *optimum* di 37°C.

Gli stafilococchi sono batteri ubiquitari e fanno parte della normale flora microbica dei mammiferi, infatti sono isolati frequentemente da cute, mammella, latte e alimenti di origine animale. Esistono oltre 30 specie di stafilococchi, tra questi *Staphylococcus aureus* riveste un ruolo importante nella patologia animale causando numerose malattie a carattere endemico o sporadico, alcune delle quali, ad esempio le mastiti, di grande rilevanza economica.

Nell'uomo *S. aureus* è generalmente causa di malattie della cute e delle mucose ma può causare anche infezioni sistemiche quando penetra attraverso ferite o cute lesa provocando ascessi, polmoniti, meningiti, endocarditi e setticemia.

L'insorgenza di cloni di *S. aureus* meticillino resistenti (MRSA) è avvenuta nel corso del tempo in almeno tre ambiti diversi che hanno visto mutare i soggetti coinvolti nelle infezioni: persone ospedalizzate, quindi infezioni umane di origine nosocomiale, persone non correlate ad ambienti ospedalieri e animali.

1.2 *Staphylococcus aureus* e antibiotico resistenza

Tra le varie molecole ad azione antimicrobica, gli antibiotici β -lattamici sono ampiamente utilizzati in Medicina Veterinaria sia negli animali da produzione che da compagnia per il trattamento e il controllo delle infezioni batteriche (DANMAP, 2005; Stegemann et al., 2006).

Le penicilline naturali e le cefalosporine di prima generazione sono attive nei confronti dei batteri Gram positivi, mentre le amino-penicilline presentano un'attività anche verso i batteri Gram negativi. Le cefalosporine di terza e quarta generazione, infine, hanno il più ampio spettro d'azione agendo sia nei confronti dei batteri Gram positivi che negativi (Prescott et al., 2000).

Il meccanismo d'azione degli antibiotici β -lattamici (ad es. penicillina e cefalosporina) si attua attraverso l'inattivazione di alcune proteine (PBPs), che si trovano sia a livello di membrana che di citoplasma, necessarie per l'assemblaggio della parete batterica; queste proteine, infatti, sono coinvolte nella sintesi del peptidoglicano, che rappresenta una parte fondamentale della parete dei batteri Gram positivi. L'inibizione di tali proteine porta inevitabilmente ad alterazioni della struttura della parete batterica e, rendendola più fragile, determina una lisi cellulare di tipo osmotico.

La resistenza ai β -lattamici è da imputare almeno a tre diversi meccanismi: alterazione del target della molecola antibiotica, inattivazione della molecola attraverso le β -lattamasi e l'inaccessibilità della molecola a raggiungere il target specifico (*penicillin-binding proteins*) (Tabella 1). La resistenza alla meticillina nello *Staphylococcus aureus* è mediata dalla produzione di *penicillin-binding protein* (PB2A), proteina di 78 K-Da a bassa affinità per la penicillina codificata dal gene *mecA* chiamato anche “*genomic island*” o isola di antibiotico resistenza (Katayama et al., 2000).

Tabella 1: Meccanismo di resistenza verso gli antibiotici β -lattamici (Li et al., 2007)

Gene location	Genetic determinant	Mechanism(s)	Resistance phenotype
Chromosome or plasmid	β -Lactamase encoding genes	Enzymatic inactivation	β -Lactams (types and expression levels of β -lactamases determine resistance to individual β -lactams)
Chromosome	Penicillin-binding protein encoding genes	Target alterations	β -Lactams
Chromosome	Efflux pump-encoding genes	Active efflux due to overexpressed multidrug efflux pump	Multiple antibiotics including β -lactams
Chromosome	Porin-encoding genes	Decreased influx due to the loss of porin	Multiple antibiotics including β -lactams
Chromosome	<i>oprD</i> gene of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> encoding a specific channel protein	Decreased influx due to the loss of OprD	Carbapenem β -lactams

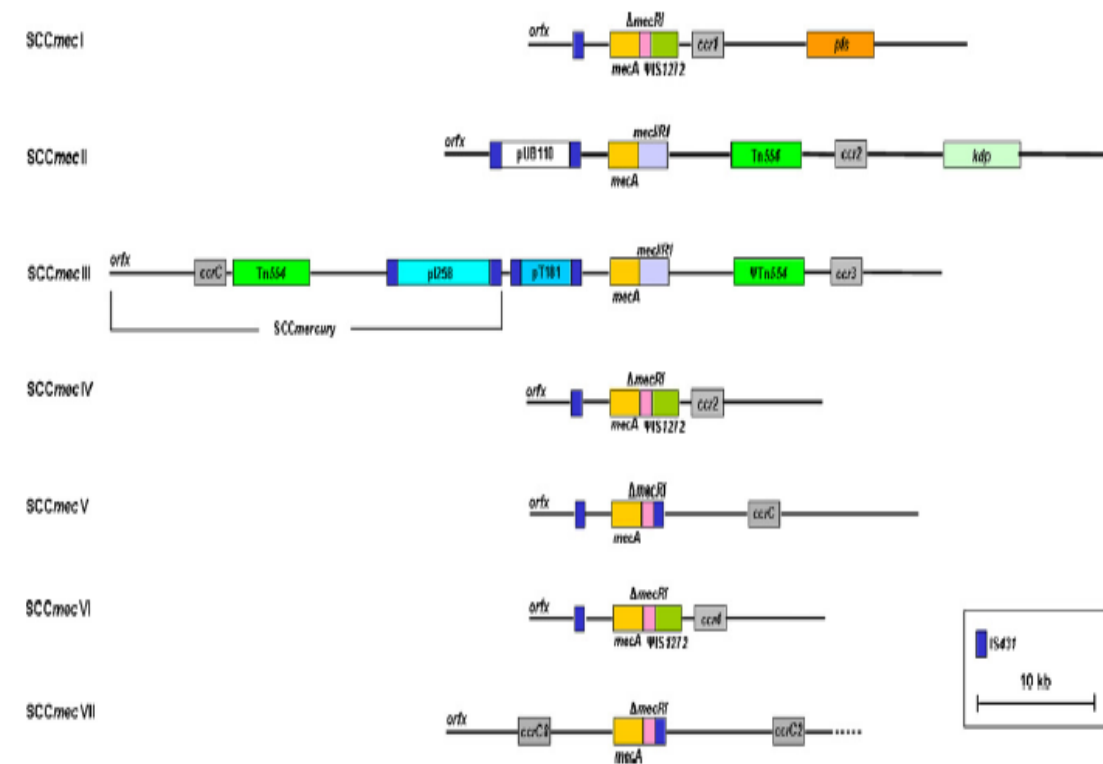
L'acquisizione del gene della meticillino-resistenza *mecA*, che codifica per *penicillin binding protein* (PBP2a), conferisce una virtuale completa resistenza a tutti gli antibiotici β -lattamici compresi quelli di origine sintetica.

La proteina PBP2a interviene nella costruzione della parete batterica quando le normali proteine PBPs sono inattivate e presenta un'affinità molto scarsa per gli antibiotici β -lattamici. Il gene *mecA* è regolato dal repressore MecI e da un “trasduttore di segnale trans-membrane β -lattamico sensibile” MecRI. In assenza di antibiotico il MecRI

reprime la trascrizione genica di *mecA*, mentre, in presenza di β -lattamici MecRI si cliva in maniera autocatalitica e un dominio citoplasmatico, parte di MecRI, diventa attivo. Passaggi successivi portano alla trascrizione di *mecA* e quindi alla produzione di PBP2a. Il gene *mecA* di 2.1 k-Da si trova in un grande elemento genetico mobile chiamato *Staphylococcal chromosomal cassette mec* (SCC*mec*) che codifica anche per la resistenza ad altri antibiotici e si inserisce in un sito specifico del cromosoma di *S. aureus* chiamato *orfX* (Ito et al., 1999).

Negli MRSA sono stati identificati diversi tipi e sottotipi di SCC*mec* ma la struttura essenziale è costituita dal complesso del gene *mec* che contiene il gene *mecA* descritto precedentemente e il complesso del gene *ccr* che codifica le ricombinasi che garantiscono la mobilità di SCC*mec*. L'analisi dei complessi SCC*mec* ha permesso di evidenziare una divergenza "genetica" tra gli HA-MRSA e i CA-MRSA. I tipi SCC*mec* tipo I, II e III, infatti sono prevalentemente riscontrati negli HA-MRSA mentre IV e V sono osservati soprattutto in CA-MRSA. Al momento si riconoscono sette maggiori tipi di SCC*mec* (dal tipo I al VII), che variano in grandezza da 20.9 k-Da a 66.9 k-Da.

Figura 1: Rappresentazione schematica dei diversi tipi di SCC*mec* (Deurenberg e Stobberingh, 2008)



Le regioni SCC*mec* pur variando in grandezza e per i geni che vi sono inseriti, sono relativamente stabili nel genoma e sono presenti anche in altre specie di stafilococchi (Ito et al.,1999). Tuttavia, l'origine o il *reservoir* del gene *mecA* non è stato ancora precisamente individuato.

Staphylococcus sciuri presenta un'intrinseca PBP che condivide l'87.8% di omologia nucleotidica con PBP2a suggerendo che esso sia il probabile precursore dell'omologo in *S. aureus* (Couto et al., 1996). Tuttavia, un recente lavoro dimostra che il locus di *mecA* del cromosoma di *Staphylococcus fleurettii* presenta una sequenza praticamente identica a quella della regione di SCC*mec* che comprende *mecA*; con grande probabilità quindi *S. fleurettii* rappresenterebbe l'origine del gene *mecA* (Tsubakishita et al., 2010).

1.3 Classificazione degli MRSA su base epidemiologica

✓ *Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA)*

Il primo isolamento di *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) risale al 1961, poco dopo l'inizio dell'uso della meticillina nel trattamento degli stafilococchi penicillino-resistenti che si erano diffusi solo due anni dopo l'introduzione della penicillina (1944) (Barber et al., 1948). La presenza di MRSA è stata riportata per la prima volta come infezione nosocomiale (*hospital acquired MRSA*, HA-MRSA), quindi a carico di pazienti ospedalizzati, tanto che fino agli anni '70 i ceppi di MRSA rappresentavano la maggior causa di infezione all'interno degli ospedali a livello mondiale. L'insorgenza e la diffusione di cloni HA-MRSA è stata associata ai tipici fattori di rischio collegati all'ambiente ospedaliero ed attualmente vengono definiti come HA-MRSA gli isolati da pazienti che erano MRSA negativi all'entrata in ospedale o gli MRSA isolati dopo 48 ore o più dall'entrata in ospedale. Si ritiene che gli MRSA si siano originati da un

S. aureus meticillino sensibile (MSSA) tramite l'acquisizione dell'elemento genetico mobile, *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). Un numero limitato di cloni con SCC*mec* si sarebbero poi diffusi a livello mondiale. Epidemie di MRSA di tipo invasivo sono state registrate specialmente in USA e Giappone tra gli anni '70 e '90; queste pandemie sono state seguite da episodi d'infezione in Europa, dove ancora vengono sporadicamente segnalati.

Attualmente, la vancomicina è l'antibiotico di scelta per la terapia dell'infezione da MRSA, ma anche per questo antibiotico si sono diffusi ceppi resistenti (VRSA), isolati per la prima volta a partire dal 1997 (Hiramatsu et al., 1997). Successive ricerche hanno evidenziato la diffusione di ceppi simili in diversi Paesi (Walsh e Howe, 2002). L'analisi di questi ceppi ha dimostrato modificazioni strutturali della parete con una riduzione dei legami tra gli strati di peptidoglicano. Gli strati più lassi, permetterebbero quindi il legame e il sequestro della vancomicina (Cui et al., 2000). I sintomi dell'infezione da MRSA sono simili a quelli delle infezioni sostenute da *S. aureus*. Gli MRSA, tuttavia, sono caratterizzati da spiccata invasività e possono essere causa di polmoniti, endocarditi, artriti settiche, osteomieliti, meningiti e setticemia. Ceppi di MRSA sono stati inoltre isolati in casi di sindrome da shock tossico, causata dalla esotossina TSST-1 oppure nella sindrome "scalded skin syndrome", dovuta all'azione delle tossine sfoliative A o B.

✓ *Community-acquired MRSA (CA-MRSA)*

Più recentemente, a partire cioè dagli anni '90, hanno avuto sempre maggior rilevanza ceppi isolati durante infezioni invasive della cute, da persone che non avevano subito procedure mediche invasive e a cui non erano associabili fattori di rischio riconducibili a HA-MRSA. Dal punto di vista epidemiologico, infatti, tali ceppi sono definiti come MRSA isolati da soggetti non ricoverati da almeno un anno e che non hanno subito interventi, che non hanno avuto degenze in case di cura, non sottoposti a dialisi e non sottoposti a cateterismi.

I ceppi di MRSA che causano tali infezioni sono stati denominati *community-acquired MRSA (CA-MRSA)*. Questi cloni, ormai endemici negli ospedali statunitensi (Gonzalez et al., 2006; Klevens et al., 2006), sono stati descritti per la prima volta negli Stati Uniti dove sono diventati un grande problema anche nella popolazione "sana", sono attualmente responsabili anche di mortalità pediatrica. I ceppi di CA-MRSA sono stati differenziati dai HA-MRSA grazie all'analisi delle caratteristiche fenotipiche e genomiche.

Mentre i ceppi di HA-MRSA, infatti, presentano un *SSCmec* relativamente grande, appartenenti alle classi I, II e III, sono resistenti a diverse classi di antibiotici non β -lattamici e raramente presentano i geni per la tossina PVL (*Pantone-Valentine*

leucocidin) che espleta un'azione litica sulle cellule bianche del sangue, i ceppi di CA-MRSA presentano *SSCmec* più piccoli e prevalentemente di classe IV e V. Inoltre non sono particolarmente resistenti ad antibiotici non β -lattamici e di frequente presentano i geni per la tossina PVL.

La maggior parte delle infezioni da CA-MRSA si manifesta attraverso infezioni della pelle e dei tessuti molli (SSTI); alcuni ceppi inoltre producono la tossina PVL .

✓ *Livestock-associated MRSA (LA-MRSA)*

Nei primi decenni dopo la seconda guerra mondiale, frequenti episodi di mastiti umane e conseguenti infezioni nei neonati da una parte e focolai di mastiti in bovine, causate dalla mungitura meccanica, hanno portato ad indagini su una possibile trasmissione di *S. aureus* tra uomo e animali (Cuny et al., 2009). Inizialmente la caratterizzazione di quei ceppi sulla base delle caratteristiche fenotipiche aveva portato alla conclusione dell'esistenza di *ecovars* adattati all'ospite nell'ambito umano, dei ruminanti e dei polli (Meyer, 1967; Witte et al., 1977; Devriese, 1984). Tali tecniche però non erano sufficienti per spiegare le relazioni genetiche tra i diversi *ecovars*. L'applicazione di tecniche più innovative ha evidenziato la separazione netta tra i ceppi di origine animale da quelli di origine umana (Musser et al., 1990). L'uso di metodiche biomolecolari ha rilevato infine che cloni di *S. aureus*, che hanno caratteristiche genetiche peculiari ed isolati nelle diverse specie animali, sono responsabili della maggior parte delle infezioni proprio all'interno di ciascuna specie ospite (Musser et al., 1990), anche se alcuni "tipi bovini" sono spesso segnalati in casi di infezione nell'uomo, suggerendo che dal punto di vista evolutivo gli MRSA dell'uomo rappresentino gli "antenati" di *S. aureus* che si riscontrano attualmente nei bovini (Aires-de-Sousa et al., 2007). Tuttavia, la comparazione tra ceppi umani ed animali evidenzia una chiara separazione dei *lineages* e l'infezione nell'uomo da parte di *S. aureus* di origine animale è stata solo segnalata sporadicamente (Meyer, 1967).

L'emergenza di MRSA in ambito veterinario è stata segnalata per la prima volta durante un episodio di mastite in una bovina da latte in Belgio nel 1972 (Devriese et al., 1972). Da allora, sono state effettuate solo sporadiche segnalazioni in specie animali quali cavalli, polli, cani e gatti (Hartmann et al., 1997; Gortel et al., 1999; Seguin et al., 1999),

solo a partire dal 2005 l'insorgenza di MRSA nelle specie domestiche è riportato con una frequenza in costante aumento. Nella maggioranza dei casi, e soprattutto nei primi isolamenti, la colonizzazione o l'infezione da parte di MRSA negli animali sembrava essere dovuta, come precedentemente riportato, alla trasmissione dall'uomo agli animali. Tuttavia, sembra che alcune specie animali fungano da *reservoirs* per cloni di MRSA che possono essere trasmessi anche all'uomo, soprattutto a quelle categorie di lavoratori che sono a stretto contatto con gli animali. I cloni di MRSA con queste caratteristiche sono stati identificati come *livestock-associated MRSA (LA-MRSA)* (Wulf e Voss, 2008). Gli MRSA "zoonotici" presumibilmente possono causare lo stesso tipo di infezioni degli altri MRSA. Finora, la trasmissione dall'animale all'uomo è stata associata ad una colonizzazione per lo più asintomatica o ad infezioni cutanee. Le lesioni cutanee riportate includono follicoliti e piccole lesioni con infiammazione moderata (Weese et al., 2005; Weese et al., 2006).

Uno specifico clone di origine sconosciuta (MRSA-ST398) è sempre più frequentemente isolato dagli animali. Tale clone colonizza diverse specie animali ma, solo in casi sporadici, determina infezione negli animali. La maggior parte degli isolati di origine suina appartengono allo stesso *multi locus sequenze type (MLST; ST398*, vedi paragrafo 1.3).

La ragione della colonizzazione da parte del clone ST-398 soprattutto nei suini (vedi paragrafo 1.4) e in altri animali da produzione, come pure alcuni aspetti della sua epidemiologia, sono tuttora da chiarire anche se l'uso di cefalosporine, tetracicline e altri antibiotici sembra avere un ruolo nella costituzione di una nicchia per questo clone.

1.4 Classificazione di MRSA su base biomolecolare

Le strategie per la prevenzione e la diffusione di MRSA necessitano di un'approfondita conoscenza sia della disseminazione di questi ceppi sia della loro epidemiologia. A questo proposito, sono state sviluppate diverse tecniche biomolecolari, tra cui la *pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)*, la *multilocus sequenze typing (MLST)*, la tipizzazione del complesso *SCCmec* e la tipizzazione della regione variabile ripetuta della proteina A (*spa typing*). L'approfondimento di queste metodiche permette di interpretare in maniera

corretta le informazioni che verranno successivamente fornite riguardo all'epidemiologia dei cloni circolanti in Europa e in Italia.

La **PFGE** è ancora considerata la metodica di riferimento per la tipizzazione degli MRSA e si è dimostrata valida per lo studio dei focolai e per la comprensione delle trasmissioni a livello ospedaliero. Tale tecnica è basata sulla digestione con l'enzima di restrizione *SmaI* del cromosoma batterico purificato e successiva corsa elettroforetica.

A causa della necessità di una rigida standardizzazione dei protocolli i database sono stati creati solo a livello nazionale. Inoltre, l'attribuzione di cluster attraverso la PFGE a *lineages* genetici può essere problematica e, alcuni ceppi, come il LA-MRSA ST398, non sono tipizzabili con i protocolli standard in quanto la presenza di un unico sito di metilazione non permette l'attività dell'enzima *SmaI* (Bens et al., 2006).

La **MSLT** è un metodo di tipizzazione molecolare che permette di valutare le differenze nucleotidiche tra gli isolati batterici. Essa risulta un'eccellente tecnica per la valutazione dell'evoluzione di MRSA. La MSLT si basa sull'analisi di varianti alleliche di sette frammenti di geni *housekeeping*.

Questo esita in un profilo allelico o *sequence type* (ST). Ad esempio il clone Iberico presenta un profilo MLST 3-3-1-12-4-4-16 definito come ST247. Normalmente la nomenclatura dei ceppi di MRSA è basata su ST e sul tipo di SCC*mec*. La popolazione di *S. aureus*, inclusi gli MRSA, consiste di diversi *lineages*, anche chiamati *clonal complex* (CCs). Per determinare a quale *lineage* appartiene un isolato, il *sequence type* deve essere determinato tramite la MLST. *Sequence type* strettamente correlate fanno parte di uno stesso CC e i ceppi di *S. aureus* sono raggruppati all'interno di un singolo CC quando 5 dei 7 geni *housekeeping* presentano sequenze identiche.

La tipizzazione di **SCC*mec*** vede in uso diversi protocolli che però non essendo ancora standardizzati presentano difficoltà nella comparazione dei risultati.

Lo *spa typing* è una tecnica messa a punto da Frenay et al., nel 1996, che si basa sull'amplificazione e il sequenziamento della regione polimorfica X della proteina A di *S. aureus*. Questa regione consiste di un numero di 24-bp ripetizioni la cui diversità è attribuita a delezioni, duplicazioni o mutazioni puntiformi. Il metodo *spa typing* assegna un codice alfa-numerico alle sequenze ripetute, basandosi sul loro ordine e composizione; le sequenze ripetute *spa* sono quindi automaticamente assegnate ad uno *spa typing* tramite l'invio della sequenza al database RidomStaph *type* (www.spaSpaserver.ridom.de); questo database permette una nomenclatura universale e

un pubblico accesso ai dati. Il sito è accessibile gratuitamente e le sequenze e gli *spa types* possono essere inoltre scaricate.

A causa del grande potere discriminatorio diversi *spa type* possono essere riscontrati nello stesso ST, come determinato da MLST, rimanendo all'interno di un *cluster* clonale assegnato.

Clone	MLST profile	ST	CC	SCC _{mec}	spa type ^a	Geographical spread ^b
Archaic	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I	t008, t009, t194	Ast, Den, Ger, Swi, Uga, UK, USA
Southern Germany	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I	t001, t023, t041, t188, t201	Bel, Den, Ger, Ita, Slo, Spa, Swi
UK EMRSA-3	1-4-1-4-12-1-10	5	5	I	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Arg, Nor, Pol, Slo, UK
Iberian	3-3-1-12-4-4-16	247	8	I	t008, t051, t052, t054, t200	Bel, Cro, Cze, Den, Fin, Fra, Ger, Ita, Net, Pol, Por, Slo, Spa, Swe, Swi, UK, USA
Irish-1	3-3-1-1-4-4-3	8	8	II	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Ast, Ire, UK, USA
New York/Japan	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Ast, Bel, Can, Den, Fin, Fra, Ger, Ire, Jap, Kor, Mex, Sin, Swe, Uru, UK, USA
UK EMRSA-16	2-2-2-2-3-3-2	36	36	II	t018, t253, t418, t419	Ast, Bel, Can, Den, Fin, Gre, Ire, Mex, Nor, Spa, Swe, Swi, UK, USA
Brazilian/Hungarian	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III	t030, t037, t234, t387, t388	Alg, Arg, Ast, Aus, Bra, Chi, Chn, Cze, Fin, Ger, Gre, Ind, Ids, Kor, Mon, Net, Pol, Por, Sin, Slo, Spa, Sri, Swe, Tha, UK, Uru, USA, Vie
Berlin	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV	t004, t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t230, t390	Arm, Ast, Bel, Fin, Ger, Hun, Net, Nor, Spa, Swe, Swi, USA
Paediatric	1-4-1-4-12-1-10	5	5	IV	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Alg, Arg, Ast, Bra, Col, Den, Fra, Kor, Nor, Pol, Por, Spa, Swe, Uru, UK, USA
UK EMRSA-2/-6	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Ast, Bel, Fin, Fra, Ger, Ire, Net, Nor, Tai, UK, USA
UK EMRSA-15	7-6-1-5-8-8-6	22	22	IV	t005, t022, t032, t223, t309, t310, t417, t420	Ast, Bel, Cze, Den, Ger, Ire, Kuw, NZ, Nor, Por, Sin, Spa, Swe, UK

Tabella 2: Esempio nella nomenclatura di MRSA

CAPITOLO 2

2.1 MRSA nell'allevamento suino

L'epidemiologia degli MRSA è cambiata drasticamente nel corso degli anni. Inizialmente noto esclusivamente come patogeno di ambito nosocomiale, è apparso come ceppo frequentemente riscontrato in individui "sani" in assenza di contatti con strutture ospedaliere. Più recentemente un terzo gruppo di MRSA è stato individuato in associazione al bestiame, ed in particolare modo al suino.

Questi ceppi, *livestock-associated* (LA-MRSA) sono stati isolati in Europa, Nord America e Asia sia nell'uomo che negli animali. Un tipo particolare di MRSA classificato in base alle caratteristiche molecolari, l'ST398 è il clone dominante tra quelli circolanti negli animali. Questo *sequence type* è stato anche definito come MRSA non tipizzabile a causa dell'impossibilità dell'enzima di restrizione *SmaI* di tagliarne il DNA per la presenza di un'unica metilasi (Bens et al., 2006).

ST398 è stato isolato per la prima volta in allevatori di suini in Francia (Armand-Lefevre et al., 2005). In questo studio è stato evidenziato un tasso più alto di allevatori positivi per MRSA (44.6% vs 24.1%) rispetto ai controlli. La maggior parte degli isolati erano *S. aureus* meticillino sensibili (MSSA) e 19 diversi MLST furono identificati, tra questi anche MRSA. I ceppi isolati dagli allevatori includevano il ST398 e il ST9, altro tipo di MRSA riscontrato anche in indagini successive in associazione all'allevamento suino (Armand-Lefevre et al., 2005; Battisti et al., 2010; Cui et al., 2009).

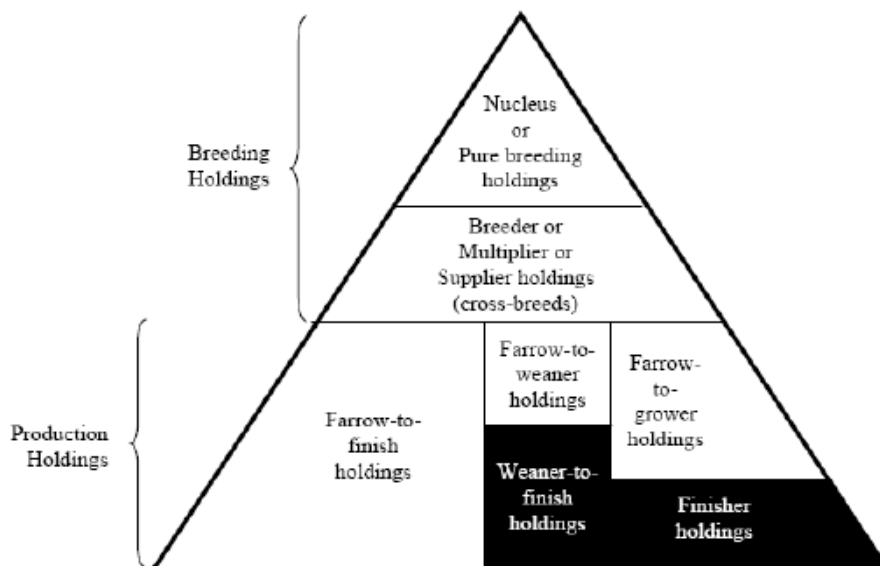
Molti dei primi studi sugli MRSA suini sono stati condotti nei Paesi Bassi; un primo lavoro descriveva l'infezione in un neonato di 6 mesi (Voss et al., 2005); le indagini sui genitori del neonato, che vivevano in un'azienda suina, riscontrarono la colonizzazione da parte di MRSA. Indagini successive sui suini della regione e sugli allevatori hanno evidenziato colonizzazione nel 23% degli allevatori e 1 suino positivo, inoltre tutti i ceppi appartenevano a ST398.

Uno studio condotto in 9 macelli olandesi, dove venivano macellati suini di diverse tipologie di allevamento ha permesso di isolare MRSA dall'11% dei suini e dal 23% degli allevamenti (de Neeling et al., 2007).

Per valutare la prevalenza e la varietà di MRSA nella produzione primaria di suini e per fornire informazioni sui potenziali fattori associati a tale prevalenza nel 2008, nei Paesi dell'Unione Europea, è stato condotto uno studio in parallelo ad uno studio di sulla prevalenza di Salmonella spp. in allevamenti di suini da riproduzione (The EFSA Journal, 2009b).

L'indagine distingueva due tipi di allevamento: **allevamenti da riproduzione**, ovvero allevamenti che ospitano suini da riproduzione e li forniscono per la sostituzione ad allevamenti da produzione e ad altri allevamenti da riproduzione, e **allevamenti da produzione** con suini da riproduzione, ovvero allevamenti che ospitano suini da riproduzione e che producono principalmente suini da ingrasso o da macello. Per l'indagine sono stati raccolti campioni ambientali (polvere di 5 diversi recinti per allevamento) e gli isolati sono stati quindi sottoposti a tipizzazione tramite *spa typing*. Lo studio ha coinvolto 24 Paesi membri europei e altri due Paesi europei, Norvegia e Svizzera.

Figura 2: Descrizione degli allevamenti da riproduzione e produzione inclusi nell'indagine sugli MRSA condotta a livello Europeo, in nero le tipologie di allevamento non indagate (The EFSA Journal, 2009b).



I dati relativi all'indagine sono stati resi noti dall'Agenzia Europea per la sicurezza alimentare (EFSA): nel 2009 è stata pubblicata la parte A della relazione che riguarda

l'analisi della prevalenza di allevamenti MRSA-positivi (The EFSA Journal,2009b). L'indagine ha interessato complessivamente 1421 allevamenti da riproduzione e 3176 allevamenti da produzione e ha permesso di dimostrare che ceppi di MRSA sono comunemente riscontrati negli allevamenti con suini da riproduzione all'interno dell'Unione Europea, anche se con forti differenze tra un paese e l'altro. Complessivamente 17 Stati membri su 24 partecipanti hanno riscontrato MRSA nei loro allevamenti e ST398 è stato il *sequence type* (ST) più frequentemente isolato.

Dodici dei 24 Stati membri hanno isolato MRSA negli allevamenti da riproduzione rilevando una prevalenza di allevamenti positivi per MRSA e per MRSA ST398, del 14% e del 13,1% rispettivamente. A seconda però dello Stato membro sono state osservate grandi oscillazioni di prevalenza, dallo 0% al 46%. Un Paese membro ha inoltre isolato un ceppo non ST398 in un allevamento da riproduzione.

Sedici Stati membri e un Paese terzo hanno rilevato MRSA negli allevamenti da produzione; la prevalenza per MRSA e MRSA ST398 era rispettivamente del 26,9% e del 25,5%; i ceppi non ST-398 sono risultati invece solo l'1,4%. Anche in questo caso le differenze di prevalenza tra i Paesi sono state evidenti.

Tramite l'analisi genetica dei ceppi isolati, è stata dimostrata una notevole varietà di *spa type* sia all'interno degli allevamenti da riproduzione che da produzione. Tuttavia, lo *spa type* t011 è apparso come tipo dominante seguito dai tipi t108 e t034. Tutti questi *spa type* sono associati a ST398/CC398.

Sono stati inoltre isolati *spa type* appartenenti a MRSA non ST398 in allevamenti da produzione e, in misura minore, in allevamenti da riproduzione e, in particolare i ceppi noti nella medicina umana ST5, ST8, ST132.

Figura 3: Prevalenza di allevamenti da riproduzione positivi per MRSA, (The EFSA Journal, 2009b).



Figura 4: Prevalenza di allevamenti da riproduzione positivi per MRSA ST398, (The EFSA Journal, 2009b).

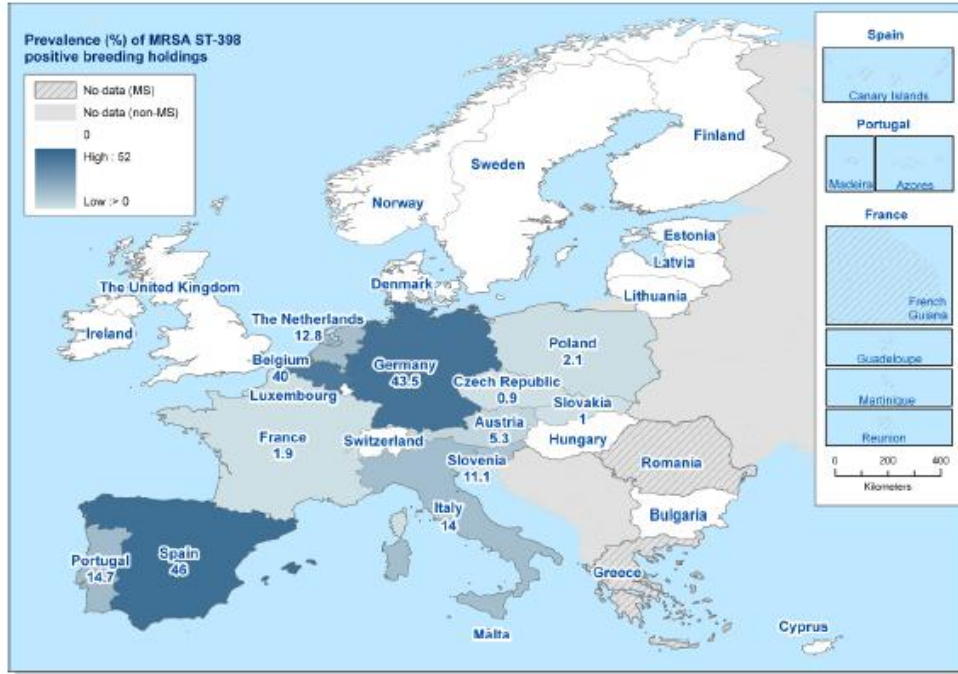


Figura 5: Prevalenza di allevamenti da produzione positivi per MRSA, (The EFSA Journal, 2009b).



Figura 6: Prevalenza di allevamenti da produzione positivi per MRSA ST398, (The EFSA Journal, 2009b).



Figura 7: Prevalenza di allevamenti da produzione positivi per MRSA non-ST398, (The EFSA Journal, 2009b).



Un'analisi più approfondita, tramite la tipizzazione dei ceppi attraverso lo *spa typing*, ha identificato 37 *spa type* tra gli MRSA isolati negli allevamenti con suini da riproduzione. Questi *spa type* appartengono a 8 *sequence type* (ST) e 8 *clonal complex* (CC), come dimostrato nella tabella seguente.

Tabella 3: Tavola di traduzione degli *spa type* in *sequence type* e *clonal complex*, (The EFSA Journal, 2009b).

MLST-type	Samples with MLST-types	Clonal complex	<i>spa-type</i>	Samples with <i>spa-types</i>	Repeat sequence
ST398	518	CC398	t011	353	08-16-02-25-34-24-25
			t108	60	08-16-02-25-24-25
			t034	42	08-16-02-25-02-25-34-24-25
			t899	20	07-16-23-02-34
			t1197	8	08-16-02-25-46-24-25
			t1451	4	08-16-02-25-34-25
			t567	3	08-02-25-24-25
			t1255	3	08-16-34-24-25
			t1939	3	07-23-02-34
			t2329	3	08-16-159-25-24-25
			t2922	3	07-16-23-34
			t2370	2	08-16-16-02-25-02-25-34-24-25
			t2510	2	08-17-25
			t571	1	08-16-02-25-02-25-34-25
			t1250	1	08-16-02-25-02-25
			t1344	1	08-24-25
			t1456	1	08-16-02-25
			t1457	1	08-16-02-25-34-02-25-34-24-25
			t1793	1	08-16-02-25-02-25-34-24-24-25
			t2330	1	08-16-02-25-34-24-25-25
			t2346	1	08-16-02-25-34-24-24-25
t3479	1	08-16-02-25-24-24-25			
t4659	1	08-16-02-25-24-24-24-24-25			
t4838	1	283-16-23-02-34			
t4854	1	08-16-02-25-24			
t4872	1	08-16-02-25-34-24-25-34-24-25			
ST1	22	CC1	t127	22	07-23-21-16-34-33-13
ST97	14	CC97	t1730	8	26-23-101-21-17-34-34-34-34-33-34
			t426	2	26-23-12-21-17-34-34-34-34-33-34
			t3992	2	26-23-12-21-17-34-34-33-34
			t2112	1	26-23-12-21-17-34-34-34-34-33-34
t5487	1	26-33-12-12-34-34-33-34			
ST39	2	CC39	t007	2	15-12-16-16-16-16-02-25-17
ST5	1	CC5	t002	1	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
ST8	1	CC8	t008	1	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
ST132	1	CC133	t1403	1	03-23-24
ST9	1	CC9	t1430	1	07-16-23-02-12-23-02-34
-	1	-	Non-typable	1	-

In particolare, 15 diversi *spa type* sono stati isolati negli allevamenti da riproduzione e ben 34 negli allevamenti da produzione.

Anche al di fuori dei Paesi europei è stata evidenziata la circolazione di MRSA di origine suina. Negli Stati Uniti, uno studio del 2009 che ha esaminato 299 suini e 20 operai di 2 allevamenti di suini ha mostrato una percentuale di suini positivi per MRSA del 49% e del 45% tra gli operai; tutti gli isolati appartenevano al ST398 (Smith et al., 2009).

A differenza di Europa e America, il ST398 non è il tipo predominante in Asia; la tipizzazione di alcuni ceppi ha mostrato appartenenza allo *spa type* t899 e tramite MLST l'appartenenza a ST9 e ST1376 (Wagenaar et al., 2009).

La parte B della relazione EFSA, invece, riguarda l'analisi dei fattori di rischio per la contaminazione da MRSA degli allevamenti, correlata da un'analisi della relazione tra prevalenza di MRSA negli allevamenti da riproduzione e da produzione e da un'indagine sull'associazione tra importazioni intra-comunitarie di suini da riproduzione e prevalenza di MRSA in un dato Paese.

I risultati hanno mostrato che il rischio di contaminazione da MRSA cresce all'aumentare del numero di suini da riproduzione ospitati negli allevamenti, sia quelli da riproduzione che da produzione. Questo effetto potrebbe rispecchiare un maggiore rischio di introduzione e/o diffusione di MRSA negli allevamenti più numerosi a causa della sostituzione più intensiva dei capi, ma anche l'impatto di altri fattori di rischio sottostanti e associati a caratteristiche strutturali e/o alle pratiche gestionali tipiche dei grandi allevamenti (The EFSA Journal, 2010).

Tali dati sono supportati da lavori scientifici dove viene dimostrato che gli allevamenti e ciclo aperto hanno una prevalenza più alta di animali MRSA positivi (94%) rispetto agli allevamenti a ciclo chiuso (56%) (Denis et al., 2008). A questo proposito, anche un'indagine svolta nei Paesi Bassi ha mostrato che tra le aziende che acquistano animali da aziende MRSA positive, il 66,7% è positivi per MRSA mentre solo il 20% delle aziende che acquistano capi da aziende negative per MRSA, risultano positive (Broens et al., 2011c).

All'interno degli allevamenti suini, inoltre, alcuni studi hanno mostrato che gli animali più giovani tendono ad avere una prevalenza più alta di MRSA rispetto ai soggetti adulti (Denis et al., 2008; Smith et al., 2008).

Poiché il commercio dei suini da riproduzione è molto sviluppato sia all'interno dei singoli Stati membri che a livello trasversale e potrebbe favorire la diffusione di MRSA negli allevamenti di destinazione, è stata inoltre valutata l'associazione tra prevalenza di

allevamenti da riproduzione MRSA positivi e prevalenza di allevamenti da produzione MRSA positivi in un dato Paese. In tale ambito è stata osservata una correlazione forte e positiva. Inoltre utilizzando i dati TRACES (*Trade Control and Export System*) sul commercio intra-comunitario dei suini da riproduzione ha rilevato un'associazione tra la prevalenza di allevamenti MRSA positivi e il volume delle importazioni di suini da riproduzione del Paese in questione.

2.2 Situazione epidemiologica in Italia

In Italia è stato condotto uno studio nel 2009 (Battisti et al., 2010) con lo scopo di stimare la prevalenza di MRSA in allevamenti di finissaggio e per caratterizzare i ceppi raccolti, sia dal punto fenotipico che molecolare, ai fini epidemiologici. Gli allevamenti sono stati selezionati tramite procedure di campionamento random dal registro nazionale delle strutture per l'allevamento suino destinato alla macellazione. Tramite questa procedura sono stati selezionati 118 allevamenti di 29 province appartenenti 10 regioni. Da ciascun allevamento sono stati raccolti 60 tamponi nasali analizzati successivamente in pool da 10. L'analisi di questi campioni ha evidenziato come i suini allevati in Italia siano un *reservoir* importante di MRSA; quasi il 40% degli allevamenti sono stati trovati positivi per MRSA. Sono stati evidenziati 11 *spa type* diversi tra i 102 ceppi di MRSA isolati, tre dei quali non erano mai stati descritti prima (t4794, t4795, t4838), e appartenenti a 5 diversi profili MLST (ST398, ST1, ST9, ST1476) (Tabella 4). Questi *spa type* clusterizzano in *lineages* associati agli animali (ST398, ST9, ST(CC)97, in 36 allevamenti) e all'uomo (ST1, in 7 allevamenti).

Tabella 4: *Spa type* e profili MLST riscontrati negli allevamenti italiani (Battisti et al., 2009)

Spa-type	ST	n holdings where it was detected	% among positive holdings	% holdings surveyed
t011	398	4	8.9	3.4
t034	398	6	13.3	5.1
t108	398	4	8.9	3.4
t2510	398	1	2.2	0.8
t4838	398	2	4.4	1.7
t2922	398	4	8.9	3.4
t899	398	22	48.9	18.6
t4794	9	1	2.2	0.8
t4795	97	3	6.7	2.5
t127	1	7	15.6	5.9
t1730	1476	10	22.2	8.5

Lo *spa type* maggiormente prevalente è risultato il t899 e la presenza di più *spa type* nello stesso allevamento appartenenti a ST398, CC97 e ST1 suggeriscono l'introduzione successiva di nuovi ceppi nel corso del tempo, (Tabella 5).

Holding code	n spa-types	Spa-types	Spa-type relatedness	STs
1	2	t011, t108	Related	398
2	3	t127, t899, t1730	Unrelated	1, 398, 1476
3	3	t011, t899, t1730	Unrelated	398, 1476
4	2	t108, t899	Unrelated	398
5	4	t034, t899, t2510, t4795	Unrelated	398, 97
6	2	t108, t2922	Unrelated	398
7	3	t127, t899, t2922	Unrelated	1, 398
8	2	t127, t2922	Unrelated	1, 398
9	2	t127, t899	Unrelated	1, 398
10	2	t1730, t4795	Related	1476, 97
11	2	t1730, t034	Unrelated	1476, 398

Tabella 5: allevamenti con più di uno *spa type* o ST (Battisti et al., 2009)

Lo studio condotto da Battisti et al., (2010) ha evidenziato una grande variabilità degli *spa type* e dei *sequence type* (11 *spa type* che clusterizzano in ben 5 ST differenti), circolanti negli allevamenti suini italiani. La presenza di più *spa type* all'interno dello stesso allevamento potrebbe favorire, secondo gli Autori, lo scambio e la diffusione di determinanti per la virulenza tra diversi *lineages* di MRSA.

Nello studio, inoltre, si ipotizza che i suini non siano solo l'ospite competente e il possibile *reservoir* di MRSA del CC97, associato ai bovini, ma anche del ST1, associato all'uomo, rappresentando quindi una possibile fonte di esposizione del patogeno per la comunità.

2.3 MRSA ST398 in categorie di persone a rischio

A causa della grande diffusione degli MRSA negli animali, in particolar modo del clone ST398, ed a causa della riconosciuta possibilità di trasmissione all'uomo, sono state condotte diverse ricerche con lo scopo di valutare la prevalenza di MRSA di origine animale nell'uomo e per approfondire alcuni aspetti epidemiologici analizzando popolazioni a rischio di colonizzazione, come i veterinari, gli allevatori e le loro famiglie.

L'importanza di tali studi risiede anche nel fatto che sempre più frequentemente vengono riportati casi di infezione anche gravi causate da MRSA e MSSA ST398. Negli ultimi anni sono state infatti segnalate forme minori o localizzate, ad esempio ascessi (Fanoy et al., 2009), infezioni dei tessuti molli (Declerq et al., 2008; van Rijen et al., 2008), infezioni del tratto urinario (van Belkum et al., 2008) e mastiti (Huijsdens et al., 2006), ma anche infezioni di tipo invasivo come batteriemia (Soavi et al., 2010), polmoniti (Witte et al., 2007) ed osteomieliti (van Rijen et al., 2008).

Diversi Paesi europei, anche grazie all'aumento delle misure di sorveglianza, hanno riportato un netto incremento della prevalenza di ST398 tra i ceppi di MRSA isolati dall'uomo; ad esempio nei Paesi Bassi la prevalenza è passata da 0% nel 2002 al 30% nel 2007 (van Loo et al.), mentre in Germania, gli *spa type* associati a ST398 nell'uomo, sono passati dal 13% del 2005 al 22,4% del 2008 (Kock et al., 2009). In entrambi i Paesi il contatto tra l'uomo e gli animali, nello specifico suini e bovini, sembra rappresentare il maggiore fattore di rischio per la colonizzazione da MRSA.

Molti studi condotti su veterinari o allevatori hanno evidenziato il rischio occupazionale per la colonizzazione da MRSA. Di seguito vengono riportati i recenti dati sulla prevalenza di MRSA in queste categorie.

Su 272 partecipanti ad una conferenza in Danimarca, il 12,5% è risultato positivo e 31 ceppi isolati (91,2%) appartenevano a t011, t108, t571, t567 e t899 corrispondenti al ST398. I partecipanti, veterinari e allevatori di suini, risultati positivi provenivano da diversi Paesi: Belgio, Danimarca, Canada, Germania, Italia, Paesi Bassi, Spagna e Thailandia dimostrando la diffusione mondiale di tale *lineage* (Wulf et al., 2008).

Un'alta prevalenza di MRSA ST398 (23%) è stata riportata anche in individui esposti (veterinari, ispettori della carne, persone coinvolte nel *management* e nella salute dei suini) in un'indagine condotta nel nord-ovest della Germania (Blaha et al., 2008). Uno studio svolto su personale veterinario e studenti di Medicina Veterinaria che partecipavano ad una conferenza sugli animali da reddito nei Paesi Bassi, ha evidenziato che il 4,6% dei partecipanti era colonizzato da MRSA (Wulf et al., 2006).

Anche studi americani hanno riportato dati sovrapponibili a quelli riportati dai ricercatori europei: in Canada, un'indagine sulla colonizzazione da parte di MRSA in

allevatori di suini, ha mostrato una prevalenza tra questi ultimi del 20% ed una stretta correlazione tra la presenza di MRSA nei suini e nell'uomo (Khanna et al., 2008).

Un'indagine svolta tra i 417 partecipanti ad una conferenza internazionale negli Stati Uniti, ha evidenziato che il 16% dei portatori di MRSA (15 su 96) erano veterinari di grossi animali, mentre solo il 4,4% dei veterinari di piccoli animali erano positivi. Nessuno dei ricercatori presenti alla conferenza risultava infine positivo per MRSA (Hanselman et al., 2006).

Una recente ricerca sulla persistenza di MRSA in persone a contatto con suini e vitelli ha dimostrato che una esposizione anche di breve termine a questi animali esita frequentemente in una acquisizione da parte dell'uomo di MRSA. Tuttavia, solo dopo 24 ore dopo l'esposizione, il 94% delle persone colonizzate risultano negative. L'ipotesi degli Autori è quella per cui l'alta prevalenza riscontrata nei veterinari e negli allevatori in indagini *cross-sectional* sia parzialmente dovuta a contaminazioni ripetute piuttosto che a colonizzazioni vere e proprie (van Cleef et al., 2011).

Altri studi più approfonditi riguardanti l'epidemiologia, l'evoluzione clinica e il controllo della malattia, sono stati pubblicati nel corso degli anni: nel 2004, la moglie di un allevatore di suini ha sviluppato una mastite ed una pleurite da MRSA; sebbene fosse stata trattata con successo con teicoplanina, la terapia per l'eradicazione fu infruttuosa e il successivo screening del marito e della figlia dimostrò la loro colonizzazione. Dopo sei mesi, un monitoraggio più ampio evidenziò la positività di 3 addetti all'allevamento dei suini e di 10 suini per ceppi di MRSA non tipizzabili tramite PFGE, tutti identici tra loro (*spa type* t108, ST 398, SCC*mec* V) (Huijsdens et al., 2006).

La segnalazione di una infezione invasiva causata da un ceppo di MRSA (ST398) di origine suina è stata riportata anche in Italia da Pan et al., nel 2009: un uomo di 58 anni fu ammesso al reparto di chirurgia con febbre da una settimana e un intenso dolore al muscolo gluteo. L'uomo lavorava in un allevamento suino, era diabetico e con ipertensione. Le immagini della risonanza magnetica mostrarono una cellulite, piomiosite e un ascesso multiloculato a livello muscolare.

Un'indagine epidemiologica condotta su 3 addetti all'allevamento e sulla famiglia ha dimostrato la colonizzazione di 1 aiutante con un ceppo di *S. aureus* meticillino sensibile (MSSA) e dagli altri soggetti ceppi di MRSA. Il campionamento all'interno

dell'allevamento ha portato all'isolamento di 7 ceppi di MRSA e l'analisi molecolare dei ceppi ha quindi evidenziato una identità tra i ceppi isolati dal paziente e quelli isolati in un'unità di produzione dell'allevamento. Tutti i ceppi di *S. aureus* isolati, sia MSSA che MRSA, appartenevano a t899 o t108 dell'ST398, in accordo con le osservazioni condotte da altri Autori che si ipotizzano che ST398 MSSA, ceppo potenzialmente patogeno, possa acquisire diversi *SSCmec* con relativa facilità.

2.4 MRSA negli alimenti di origine animale

Staphylococcus aureus rappresenta una delle maggiori cause di intossicazione alimentare a causa della produzione di enterotossine, che, quando presenti nell'alimento, provocano vomito e diarrea. Nel 2006 le tossine stafilococciche sono state individuate come la causa del 48,8% dei focolai di intossicazione causate da tossine batteriche nei paesi dell'Unione Europea (The EFSA Journal, 2009c). Nel Regolamento CE 2073/2005 si specifica che in “formaggi, latte in polvere e siero di latte in polvere” immessi sul mercato, durante il loro periodo di *shelf-life* le enterotossine stafilococciche devono essere assenti; nel Capitolo 2 del Regolamento, è specificato il numero massimo di stafilococchi coagulasi-positivi che possono essere presenti in alcuni tipi di alimenti tra i quali formaggio a base di latte crudo e formaggi sottoposti a trattamento termico. I cibi coinvolti maggiormente nelle intossicazioni da parte di *S. aureus* sono quelli di origine avicola, le carni cotte consumate fredde e i prodotti di pasticceria con crema. In particolare, carni salate possono essere un veicolo per questo microrganismo, in quanto esso è relativamente resistente ad alte percentuali di sale.

La presenza degli MRSA negli alimenti non è normalmente ricercata anche se tali batteri, analogamente agli MSSA, presentano i geni codificanti per le enterotossine; ad oggi comunque è stato riportato un solo caso di intossicazione dovuta a MRSA (Jones et al., 2002) ed un ulteriore studio ha individuato nel cibo la fonte di disseminazione di MRSA durante un focolaio avvenuto in un ospedale nei Paesi Bassi (Kluytmans et al., 1995). In entrambi i casi, tuttavia, i ceppi isolati erano di origine umana e, fino ad oggi, il CC398 non è mai stato associato ad una intossicazione alimentare. Anche se le caratteristiche fenotipiche del CC398 non sono state sistematicamente investigate, i

ceppi appartenenti a questo *clonal complex* sono simili agli altri ceppi di *S. aureus* e capaci quindi di crescere e sopravvivere in condizioni simili. Vista l'importanza degli animali e dei loro prodotti quali fonte di colonizzazione per l'uomo e vista anche la possibilità di contaminazioni degli alimenti da parte dell'uomo stesso, il campionamento degli alimenti con lo scopo di individuare MRSA dovrebbe essere focalizzato sugli alimenti di origine animale e sugli alimenti pronti per il consumo, per i quali i processi di produzione prevedono un'intensa lavorazione.

Nelle tabelle seguenti vengono riportati le segnalazione di MRSA in diverse matrici alimentari, raccolte all'interno dell'opinione espressa dall'EFSA nell'ambito della valutazione scientifica sull'importanza di MRSA negli animali e negli alimenti (The EFSA Journal, 2009a).

Year	Country	Food type	Method	Proportion of MRSA contamination	ST- <i>spa</i> -SCC <i>mec</i> typing	Other typing	Reference
1992	Pakistan	Raw milk	Enumeration of <i>S. aureus</i> on Baird-Parker agar plates, followed by disk diffusion testing	8/77 isolates (10.4%) From 50 milk samples			(Farzana, K. <i>et al.</i> , 2004)
1999, 2000, 2003	Korea	Cows milk	Direct streaking of samples on 5% sheep agar plates and later sampling on Baird-Parker agar plates	14 MRSA and 1 silent <i>mecA</i> ⁺ -MSSA (isolation ratio 0.18%).	14 MRSA: ST5- SCC <i>mec</i> -IVg-PVL ⁺ 1 silent <i>mecA</i> ⁺ -MSSA: ST580-PVL ⁺ non-typeable		(Kwon, N.H. <i>et al.</i> , 2005)
2001-2003	Korea	Foodstuff's from slaughterhouses and retail (pork, chicken and beef)	Not given	0/159 pork samples (0%) 0/75 beef samples (0%) 2/620 chicken samples (0.3%)	ST5- SCC <i>mec</i> III silent <i>mecA</i> ⁺ -MSSA ST5 non typable		(Kwon, N.H. <i>et al.</i> , 2006)
2001-2003	Korea	Samples from cattle, pigs and chickens	Enrichment in <i>Staphylococcus</i> broth or TSB plus 70 mg/ml NaCl and later sampling on Baird Parker plates	0/126 specimens from beef cattle (0%) 12/1022 from dairy cattle (1.2%) 0/469 from pigs (0%) 3/296 from chickens (1.0%)		AP-RAPD: six food isolates similar to those of humans.	(Lee, J.H., 2003)
2001	Hungary	Foods	Typing of <i>S. aureus</i> isolates	No MRSA detected			(Kaszanyitzky, E.J. <i>et al.</i> , 2003)
1981-2002	France	Various foods from Food-borne outbreaks	Typing of <i>S. aureus</i> isolates from 31 outbreaks	2/178 strains (1.1%) From sliced pork and pancakes		2 isolates: human biotypes	(Kerouanton, A. <i>et al.</i> , 2007)
2002-2003	Japan	Retail raw chicken meat	Not given	2 /444 samples (0.45%)	2 isolates: SCC <i>mec</i> IV	Human biovar	(Kitai, S. <i>et al.</i> , 2005)

Tabella 6: Reports sul ritrovamento di MRSA negli alimenti (The EFSA Journal, 2009a)

Year	Country	Food type	Method	Proportion of MRSA contamination	ST- <i>spa</i> -SCC <i>mec</i> typing	Other typing	Reference
2002-2004	Japan	Desserts (Japanese and Western style)	Enumeration of <i>S. aureus</i> on Manitol salt agar	0/368 samples			(Shimamura, Y. <i>et al.</i> , 2006)
2004	Hungary	Foods	Typing of <i>S. aureus</i> isolates	5/1,921 strains (0.26%) All from dairy herds			(Kaszanyitzky, E.J. <i>et al.</i> , 2004)
2003-2005	Italy	Foods	Typing of <i>S. aureus</i> isolates	6/1,634 samples (0.37%) 4 milk, 2 cheeses		3 isolates: ovine biovar 3 isolates: non-host specific biovar	(Normanno, G. <i>et al.</i> , 2007)
2006	Jordan	Meat samples (sheep, cow, camel, poultry)		15/157 strains from 1,260 meat samples (1.2%)			(Quddoumi, S. <i>et al.</i> , 2006)
2006	Netherlands	Raw meat at retail (pigs and cattle)	Two enrichment broth cultures and later sampling in chromogenic MRSA-ID agar	2/64 pork samples (3.1%) 0/15 beef samples (0%)	1 isolate: CC398-t108 1 isolate: T024-US300 clone		(van Loo, I.H. <i>et al.</i> , 2007)
2007-2008	Netherlands	Raw meat at retail	Two enrichment broth cultures and later sampling in chromogenic MRSA-ID agar	42/395 beef samples (10.6%) 39/257 veal samples (15.2%) 20/324 lamb/mutton samples (6.2%) 33/309 pork samples (10.4%) 83/520 chicken samples (16.0%) 41/116 turkey samples (35.3%) 4/118 fowl samples (3.4%) 4/178 game samples (2.2%) Total 264/2217 (11.9%) Low plate counts: <10cfu/g in positive MRSA samples	CC398 85% isolates (ST398 animal origin) 15% (other ST's possibly human origin)		(de Boer, E. <i>et al.</i> , 2008)

Tabella 7: Reports sul ritrovamento di MRSA negli alimenti (The EFSA Journal, 2009a)

In dieci lavori differenti svolti tra il 1999 e il 2006 in Corea, Ungheria, Francia, Giappone, Italia e Giordania la frequenza dell'isolamento di MRSA era bassa, anche testando diversi tipi di alimenti, con risultati che andavano dallo 0 al 1,2% (Lee, 2003; Kaszanyitzky et al., 2003; Kaszanyitzky et al., 2004; Kerouanton et al., 2007; Kitai et al., 2005; Kown et al., 2006; Quddoumi et al., 2006; Shinamura et al., 2006; Normanno et al., 2007).

Tabella 8: Reports sul ritrovamento di MRSA negli alimenti (The EFSA Journal, 2009a)

Year	Country	Food type	Method	Proportion of MRSA contamination	ST- <i>spa</i> -SCC <i>mec</i> typing	Other typing	Reference
2008	Spain	Food samples of chicken, beef, pigs, rabbit and lamb	Enrichment on BHI broth with 6.5% NaCl and sampling in chromogenic MRSA-ID agar	3/254 samples (1.3%) 1 of chicken 1 of rabbit 1 of pork	1 isolates: CC398-t011 2 isolates: ST125-t067		(Lopez, M. <i>et al.</i> , 2008) Lozano, C. ³
2008	United States	Retail meat (pork and beef)	Enrichment on TSB broth with 10% NaCl-1% sodium pyruvate and sampling in Baird-Parker supplemented with cefoxitin (4 µg/ml)	5/90 of pork (5.5%) 1/30 beef (3.3%)	Pork: ST8-t008-SCC <i>mec</i> IVa-PVL+ USA300 Pork- beef: ST5-t002-SCC <i>mec</i> II- USA100:		(Pu, S. <i>et al.</i> , 2009)

Simili percentuali sono state riscontrate in Spagna (1,3%) in alimenti di origine animale (Lopez et al., 2008; Lozano et al., 2009).

Lavori condotti in Pakistan e negli Stati Uniti, hanno però evidenziato percentuali più alte (10,4%) (Farzana et al., 2004; Pu et al., 2009), anche l'Agenzia per la Sicurezza Alimentare olandese campionando diverse tipologie di carni, ha riscontrato positività del 11,9% (264 campioni positivi su 2217 analizzati). Nella tabella precedente sono specificate le percentuali di positività in base all'origine del prodotto (de Boer et al., 2008).

In generale gli alimenti da cui sono stati isolati MRSA includono carne cruda di maiale, bovino, agnello, pollo, tacchino e, in un caso, anche di coniglio, in aggiunta a prodotti di origine bovina come latte e formaggio.

La tipizzazione dei ceppi isolati dagli alimenti ha portato all'identificazione di CC398, isolato da carne suina (van Loo et al., 2007) e dal 85% degli MRSA isolati da cibi di diversa origine (de Boer et al., 2008).

Altri *sequence type* (ST5 e ST125) associati ad infezioni umane sono stati riscontrati in altri studi (Known et al., 2006)

CAPITOLO III -PARTE SPERIMENTALE

3.1 STUDIO SULLA CONTAMINAZIONE AMBIENTALE IN ALLEVAMENTI SUINI IN RELAZIONE ALLA FASE PRODUTTIVA ED ALLA APPLICAZIONE DEI TRATTAMENTI DI PULIZIA E SANIFICAZIONE

MOTIVAZIONI DELLO STUDIO

Ad oggi le informazioni sul ruolo della contaminazione ambientale nell'epidemiologia della colonizzazione da MRSA nel suino sono scarse. In uno studio longitudinale sulla trasmissione di MRSA all'interno degli allevamenti (Broens et al., 2012) è stato concluso che il contatto diretto fra suini è la principale via di trasmissione di MRSA e che il ruolo della contaminazione ambientale necessita di ulteriori investigazioni. Il presente studio ha avuto lo scopo di raccogliere informazioni sul livello di contaminazione ambientale nelle diverse fasi di allevamento e sull'efficacia dei trattamenti di pulizia e disinfezione in uso negli allevamenti suini

MATERIALI E METODI

Allevamenti

Sei allevamenti suini a ciclo chiuso sono stati arruolati sulla base di precedenti accertamenti comprovanti la presenza di MRSA in gruppi di suini grassi macellati nei mesi precedenti. Tutti gli allevamenti erano situati nel Nord Italia (Province di Modena, Mantova, Brescia e Verona). Gli allevamenti selezionati differivano per dimensioni, numerosità di scrofe e management produttivo. Al momento dell'arruolamento gli allevamenti sono stati visitati e sono state raccolte informazioni circa le caratteristiche di interesse per lo studio (Tabella 9).

Tabella 9. Principali caratteristiche degli allevamenti e procedure di pulizia e disinfezione

<i>All.</i>	<i>Numero Scrofe</i>	<i>Numero siti</i>	<i>Giorni di vuoto sanitario</i>	<i>Lavaggio con acqua ad alta pressione calda (60-70°C) o fredda</i>	<i>Disinfettante in uso</i>
1	1,000	3	7	calda**	Aldeide glutarica e sali quaternari di ammonio
2	900	3	2-5	calda ***	Alchil-amine
3	2,000	2	1-3	fredda	Aldeide glutarica e sali quaternari di ammonio
4	1,000	1	2-5	calda	Alchil-amine e sali quaternari di ammonio
5	1,500	2	2-5	calda	Aldeide glutarica e sali quaternari di ammonio
6	1,550	2	4	calda	Perossidi inorganici e acidi organici e detergenti anionici

In tutti i sei allevamenti era attuata la pratica del tutto pieno/tutto vuoto. Negli allevamenti 2 e 5 tale pratica veniva applicata per gruppo di box e non per tutto il capannone nei reparti di messa a terra ed ingrasso. In tutti gli allevamenti il materiale organico veniva rimosso prima delle pratiche di C&D e un detergente veniva applicato prima della disinfezione. Negli allevamenti 3 e 6 l'utilizzo del detergente era limitato alle sale parto.

**solo nelle sale parto e nei locali di svezzamento

*** solo nelle sale parto

Campioni ambientali

All'interno di ciascun allevamento sono stati prelevati campioni ambientali da sale parto, gabbie svezzamento, locali di messa a terra, locali di ingrasso utilizzando apposite garze sterili (Sodibox®, 18 cm x 32). Le superfici dorsali delle divisioni fra i box o le gabbie sono state campionate coprendo un'area di circa 50 cm² (EFSA, 2007). Le garze venivano quindi riposte in buste di plastica sterili e conservate a 4°C per un periodo massimo di 24 ore prima della processazione. Sulla scorta di precedenti investigazioni, indicanti un elevato tasso di portatori nasali in allevamento, il numero di campioni ambientale per ciascuna fase di allevamento è stato fissato pari a 10. Infatti, secondo

Broens et al. (2011a) questo numero è sufficiente per rilevare la presenza di contaminazione ambientale in allevamenti con elevato tasso di portatori nasali. In ogni allevamento ed in ogni fase, ulteriori 10 campioni sono stati raccolti dopo le operazioni di C&D, prima dell'introduzione di nuovi soggetti. L'età degli animali presenti nelle diverse fasi variava da 0-28 giorni nelle gabbie parto, 24-75 giorni negli svezzamenti, 65-120 giorni nei reparti di messa a terra e da 110-280 giorni negli ingrassi.

I campioni ambientali sono stati analizzati secondo quanto descritto da Battisti et al. (2010). In breve, dopo una fase di pre-arricchimento del campione in Mueller-Hinton contenente 6,5% di NaCl, ed incubazione a 37°C per 24 ore, è stato eseguito un arricchimento in brodi selettivi costituiti da Phenol Red Mannitol Broth e Triptone Soya Broth addizionati con 5 mg/L di oxacillina e 44 mg/L di aztreonam. Dopo incubazione a 37°C per 16-20 ore i brodi di arricchimento selettivo sono stati seminati su due terreni selettivi: Brilliance MRSA (Oxoid,UK) e Oxacillin Resistance Screen Agar (Oxoid,UK), incubati a 37°C per 48 ore.

Le colonie sospette sono state quindi identificate come *S. aureus* tramite tecniche standard: morfologia della colonia, colorazione di Gram, test della catalasi e della coagulasi.

L'identificazione della specie tramite l'amplificazione del gene *nuc* e del gene codificante per la resistenza ai beta-lattamici *mecA* è stata inoltre effettuata tramite PCR secondo le metodiche descritte da Brakstad et al., (1992) e da Strommenger et al., (2003).

Analisi statistica

La proporzione di campioni positivi è stata analizzata utilizzando *la mixed effects logistic regression*. La fase produttiva (4 classi: sale parto – livello di riferimento -, svezzamento, accrescimento e ingrasso), l'applicazione delle operazioni di pulizia e disinfezione (C&D) (prima e dopo) e la loro interazione sono state considerate come variabili indipendenti. Dato che le misurazioni ripetute all'interno della stessa fase nel medesimo allevamento non potrebbero essere considerate indipendenti, la fase produttiva all'interno dello stesso allevamento e l'allevamento stesso come random effects, anche se la proporzione di variazione attribuibile all'allevamento e alla fase

produttiva all'interno della medesima azienda erano solo 0.014 (95% c.i. 0.001-0.076) e 0.001 (95% c.i. 0.0003 - 0.096) rispettivamente (Nakagawa and Schielzeth, 2010). L'analisi statistica è stata condotta con R (R Core Team, 2012), ed il modello della the mixed effects logistic regression è stato realizzato con "lme4" package (Bates et al., 2012).

RISULTATI

La proporzione dei campioni positive nelle diverse fasi produttive è riportata in tabella 10.

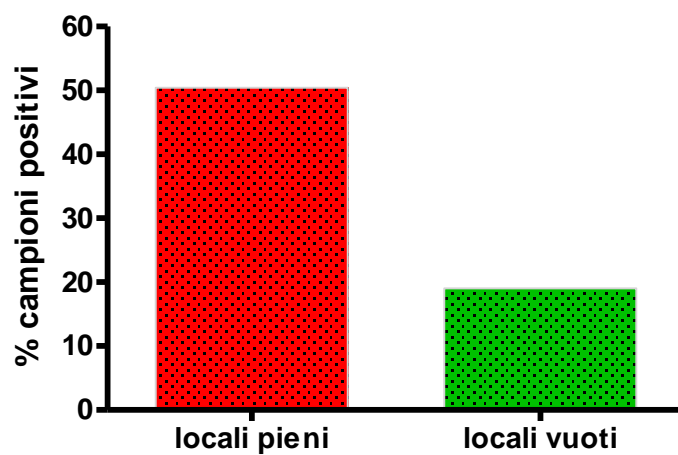
Tabella 10 Numero di campioni positivi per MRSA su 10 campioni prelevati nelle diverse fasi produttive prima e dopo le operazioni di C&D

Allev.	Gabbie parto n. campioni pos.		Svezzamenti n. campioni pos.		Accrescimenti n. campioni pos.		Ingrassi n. campioni pos.	
	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>pre</i>	<i>post</i>	<i>pre</i>	<i>post</i>	<i>pre</i>	<i>post</i>
1	9	0	8	0	8	0	2	0
2	10	1	10	10	9	4	9	2
3	4	0	9	3	6	5	3	0
4	6	0	0	0	2	7	3	2
5	3	0	2	0	6	3	1	2
6	0	0	5	4	5	2	1	1
Tutti	32/60	1/60	34/60	17/60	36/60	21/60	19/60	7/60
All.	(53.3%)	(1.7%)	(56.7%)	(28.3%)	(60%)	(35%)	(31.7%)	(11.7%)

Prima dell'applicazione delle operazioni di C&D la proporzioni di campioni positive si attesta su valori inferiori nei reparti di ingrasso rispetto alla altre fasi.

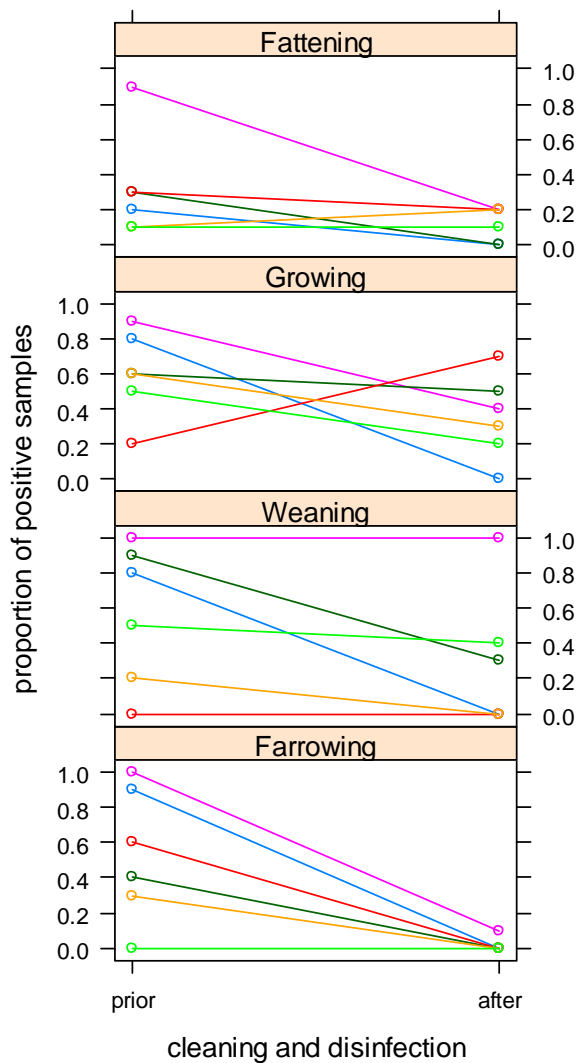
In termini generali la proporzione di campioni positivi è pari al 50% (121/240) prima degli interventi di sanificazione per poi abbassarsi al 19% (Grafico 1)

Grafico 1. Proporzione di campioni positivi (dato generale dei 6 allevamenti) prima (locali pieni) e dopo (locali vuoti) le operazioni di C&D:



In particolare il tasso di campioni positive dopo C&D subisce una notevole riduzione nelle sale parto.

Grafico 2. Proporzione di campioni ambientali positive prima e dopo C&D nelle differenti fasi produttive nei singoli allevamenti (il colore diverso indica un diverso allevamento)



I risultati della mixed effects logistic regression sono mostrati in tabella 11.

Tabella 11: Adjusted Odds Ratios stimati con il mixed effects logistic model

Term	OR lower 95% c.i.	OR	OR upper 95% c.i.	p-value
C&D (After vs Prior)	0.0002	0.0032	0.0445	0.00002
Weaning vs Farrowing	0.2863	1.3239	6.1231	0.71952
Growing vs Farrowing	0.2738	1.1976	5.2387	0.81072
Fattening vs Farrowing	0.0678	0.3046	1.3674	0.12075
C&D * Weaning	2.6265	44.3271	748.0979	0.00855
C&D * Growing	6.4960	101.9698	1600.6557	0.00100
C&D * Fattening	3.8989	67.3521	1163.4721	0.00378

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi dei risultati evidenzia un netto effetto preventivo dei trattamenti di C&D. L'entità di tale effetto non è costante in tutte le fasi produttive ma è risultato maggiore nelle sale parto rispetto alle altre fasi produttive. Nonostante che ad oggi non sia dimostrata una associazione fra l'entità della contaminazione ambientale e la prevalenza dei portatori nasali, è interessante notare che i dati relative alla contaminazione ambientale mostrano un trend simile a quelli rilevati in studi sulla colonizzazione nasale. In uno studio longitudinale Weese et al. (2010), hanno rilevato il maggior tasso di soggetti portatori a 42 giorni di vita con una tendenza alla diminuzione al giorno 70. Purtroppo, questo studio non è proseguito oltre quella età. In uno studio di tipo cross-sectional, Smith et al. (2009) hanno evidenziato il 100% di portatori nasali fra le 9 e le 12 settimane e livelli notevolmente inferiori nei grassi. In questo studio le operazioni di C&D utilizzate negli allevamenti in questione non si sono dimostrate in grado di eliminare completamente la contaminazione ambientale, con l'eccezione dell'allevamento 1 in cui tutti i campioni dopo C&D sono risultati negativi. Tuttavia, in termini generali, le operazioni di sanificazioni hanno dimostrato di ridurre tale contaminazione e l'effetto è stato assai più rilevante nelle sale parto rispetto alle altre fasi. Questo risultato appare spiegabile dal diverso livello di intensità e diligenza con cui

vengono applicati i protocolli di C&D nelle diverse fasi dell'allevamento suino. E' noto, infatti, che nei reparti di riproduzione tali protocolli sono applicati con una rigidità assai maggiore. Appare quindi evidente che, una rigida applicazione delle operazioni di igiene di allevamento, incluse accurate operazioni di C&D, possono contribuire a ridurre sensibilmente la contaminazione ambientale.

3.2 STUDIO LONGITUDINALE SULLA COLONIZZAZIONE NASALE E SULLA CONTAMINAZIONE AMBIENTALE IN UN ALLEVAMENTO SUINO A CICLO CHIUSO

MOTIVAZIONI DELLO STUDIO

Questo secondo studio è stato realizzato al fine di meglio comprendere i meccanismi e le dinamiche di diffusione della colonizzazione nasale da MRSA nell'allevamento del suino. Inoltre si è voluto mettere in correlazione la colonizzazione nasale e la contaminazione ambientale in un intero ciclo produttivo.

MATERIALI E METODI

Allevamento

Lo studio in questione è stato condotto in un allevamento di circa 1550 scrofe dislocato in due siti. Questo allevamento è stato arruolato dopo che indagini preliminari avevano permesso di rilevare elevati tassi di colonizzazione nasale da MRSA in soggetti macellati. L'allevamento è gestito in tutto pieno/tutto vuoto eseguito in ogni fase.

Operazioni di pulizia e disinfezione (C&D)

Nella sala parto viene distribuito un prodotto alcalino schiumogeno direttamente a contatto con strutture e sostanza organica. Segue lavaggio con idropulitrice (a caldo) dispersione di un disinfettante multicomposto (VIRKON S®). Nelle gabbiette di svezzamento, nella messa a terra ed ingrasso, dopo l'allontanamento dei suini, la sala viene bagnata con acqua di riciclaggio per 24 ore. Segue lavaggio con idropulitrice (a caldo) dispersione di un disinfettante multicomposto (VIRKONS®).

Utilizzo programmato di farmaci antibatterici

Non sono effettuati trattamenti antibiotici di massa nelle scrofe. In corrispondenza con il taglio della coda, i suinetti sottoscrofa ricevono una iniezione parenterale con tilosina *long acting*. I maschi dopo castrazione vengono trattati con una ulteriore somministrazione di *ossitetraciclina long acting*.

Allo svezzamento i suinetti vengono trattati per via intramuscolare con ossitetraciclina L.A. Nei primi 15 giorni del periodo di svezzamento viene somministrato un mangime medicato con doxiciclina, colistina e ossido di zinco. Nei successivi 20 giorni di gabbietta il primo mangime viene sostituito da un mangime medicato con clortetraciclina, tilosina, colistina e ossido di zinco. Nella fase di messa a terra si utilizza ancora mangime medicato, questa volta con tiamulina, colistina e ossido di zinco.

Campioni

Trenta scrofe di diverso ordine di parto sono state sottoposte a tampone nasale all' 80° giorno di gestazione. Dagli stessi animali è stato prelevato un campione cutaneo tramite strofinamento della mammella con garze sterili (Sodibox®) 3 giorni dopo il parto. Sessanta suinetti (10 suinetti da 6 scrofe di cui 5 scelte a caso e l'unica risultata colonizzata al primo prelievo) sono stati marcati individualmente con marca auricolare e sottoposti a tampone nasale secondo la seguente tempistica: tre giorni dalla nascita; un giorno prima dello svezzamento (giorno 27); fine svezzamento (giorno 75); inizio ingrasso (giorno 120); metà ingrasso (giorno 180); macellazione dopo iugulazione (giorno 270). Inoltre, attraverso l'uso dei Sodibox® sono stati raccolti 30 campioni ambientali dalla sala gestazione in presenza delle scrofe e 10 campioni rispettivamente dalla sala parto, locali svezzamento, messa a terra e ingrasso. I campionamenti ambientali sono avvenuti negli ambienti pieni (presenza di animali) e vuoti (locali puliti e sanificati in assenza di animali) seguendo il percorso degli animali marcati durante il loro ciclo di crescita. Le modalità di campionamento sono state le medesime descritte nello studio 1.

Analisi di laboratorio

La ricerca di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti è avvenuta come descritto nello studio 1.

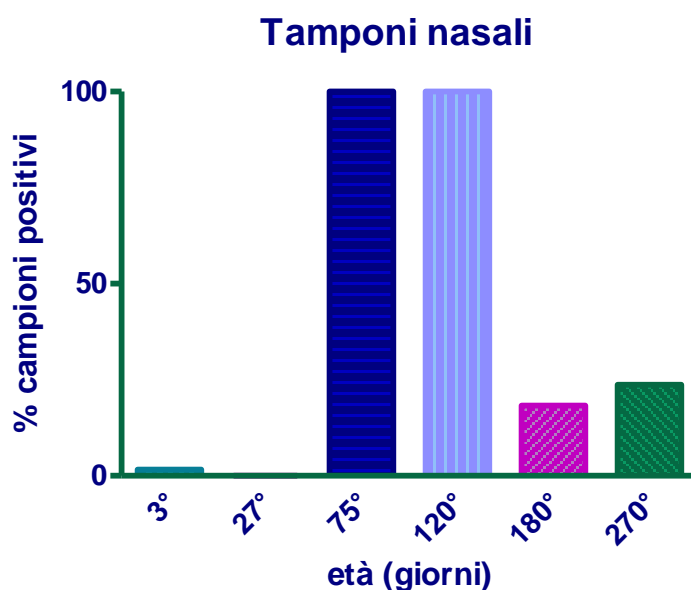
RISULTATI

Dall'analisi dei tamponi nasali effettuati sulle scrofe, solo un animale è risultato positivo per MRSA. La raccolta di Sodibox® a livello della cute della mammella ha dato esito negativo per tutte le scrofe.

La ricerca di MRSA nei tamponi nasali effettuati nei suinetti di tre giorni ha evidenziato la positività di 1 solo soggetto (1,7%). Tale soggetto non apparteneva alla nidiata della scrofa risultata positiva per MRSA dal tampone nasale.

I tamponi del 27° giorno di età sono risultati tutti negativi, mentre, nelle fasi successive (alla fine del periodo di svezzamento e all'inizio dell'ingrasso) tutti i tamponi nasali dei suini si sono dimostrati positivi per MRSA (75° e 120° giorno). Dopo 6 mesi dalla nascita (metà ingrasso, 180° giorno) i campioni positivi sono risultati 11 (18,3%). Al momento della macellazione su 59 campioni, 14 sono risultati positivi per MRSA (23,7%) (Grafico 3).

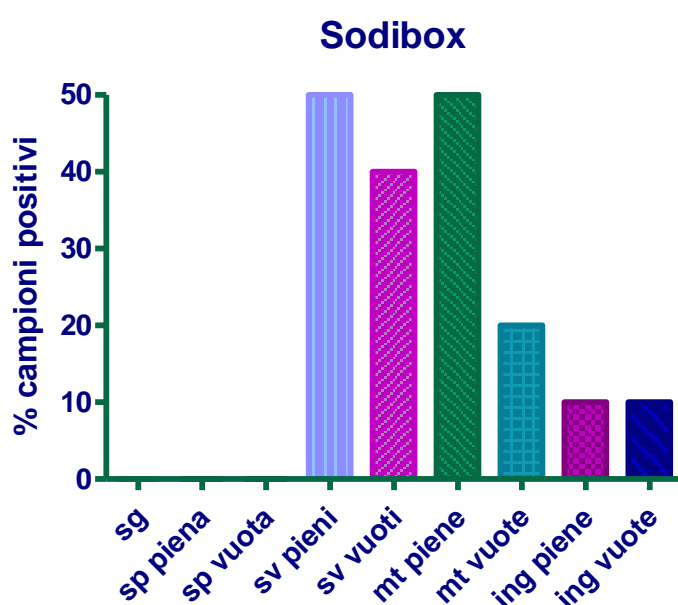
Grafico 3: Percentuali di positività dei tamponi nasali nelle diverse fasi di allevamento



Per quanto riguarda la ricerca di MRSA nell'ambiente, non sono stati riscontrati campioni positivi né a livello della sala gestazione, né nelle sale parto piene, né in quelle pulite e sanificate. Nelle gabbie di svezzamento piene sono risultati positivi 5 Sodibox®

su 10 (50%) ed in quelle vuote 4 su 10 (40%). Nella fase di messa a terra sono stati individuati 5 campioni positivi nei locali pieni (50%) e 2 nei locali vuoti (20%). Nell'ultima fase, quella di ingrasso, i campioni positivi sia degli ambienti pieni che di quelli vuoti sono risultati pari a 1 (10%) (Grafico 4).

Grafico 4: Percentuali di positività nei locali pieni e vuoti. sp: sala parto piena/vuota; sv: sala svezzamento piena/vuota; mt: locali messa a terra o pieni/vuoti; ing: locali ingrasso pieni/vuoti.



DISCUSSIONE

Lo studio longitudinale condotto in allevamento apporta informazioni originali riguardo all'epidemiologia della colonizzazione da parte di MRSA nelle varie fasi di età dei suini. Ad oggi, infatti, non vi sono lavori scientifici che prendano in considerazione periodi di monitoraggio così prolungati (9 mesi) e che, soprattutto, considerino sia la colonizzazione animale che la contaminazione degli ambienti in cui gli animali sono stabulati. Smith et al., (2009) hanno campionato, attraverso tamponi nasali, 209 suini di

7 diversi gruppi di età. A nove e 12 settimane di vita la percentuale dei tamponi positivi era del 100% per poi abbassarsi successivamente: 90%, 50%, 63%, 50% e 36% a 15, 18, 21, 24 settimane e in suini adulti. Weese et al., (2010) con uno studio longitudinale che ha coinvolto sia le scrofe che i suinetti nella fase di pre-svezzamento e di post-svezzamento hanno evidenziato una prevalenza totale nella fase di pre-svezzamento pari al 34.5%. In particolare ai giorni 1, 3, 7, 14 e 21 dopo la nascita la prevalenza dei suinetti era pari a 1%, 6,2%, 8,5%, 4,4% e 20%. Nella fase post-svezzamento la prevalenza totale era pari all'85% e pari al 34%, 65%, 50% e 42% rispettivamente ai giorni 28, 42, 56 e 70. Da questa indagine risulta inoltre che i suinetti nati da madri positive per MRSA a livello nasale nei giorni prima del parto o al momento del parto, presentano una probabilità maggiore di essere colonizzati. Tuttavia anche i suinetti nati da madri negative sono risultati positivi per MRSA nel corso dello studio. Nel presente studio non è stata osservata una correlazione tra la positività delle scrofe e quella dei suinetti; l'unico suinetto positivo nel primo campionamento (3 giorni dalla nascita) infatti è nato da una madre negativa per MRSA, mentre i suinetti nati dalla scrofa positiva sono risultati, in quel periodo di campionamento, negativi.

Nel corso dello studio è stato osservato un brusco innalzamento dei campioni positivi dei suini campionati alla fine dello svezzamento (100%). A circa 120 giorni dalla nascita (inizio ingrasso) i campioni positivi sono ancora il 100%, mentre alla fine dell'ingrasso (180° giorno) la prevalenza cala drasticamente passando al 18%, dato che viene praticamente confermato dal campionamento successivo (23%). L'andamento della prevalenza di MRSA nelle fasi di età, pur non essendo completamente sovrapponibile ai due lavori citati, è comunque paragonabile. Anche nella nostra indagine, infatti, sembra che la fase critica per la colonizzazione sia tra la quarta e l'undicesima settimana di vita. In questo studio si è registrato un andamento analogo fra i tassi di positività dei campioni prelevati dagli animali e negli ambienti nelle diverse fasi di allevamento. Nel reparto gestazione e nelle sale parto non è stata evidenziata contaminazione ambientale e solo una scrofa su trenta è risultata colonizzata. Un suinetto su 60 è risultato colonizzato a 30 giorni di vita e nessuno su 60 alla fine del periodo sottoscrofa. Nel periodo successivo, nei locali di svezzamento, la prevalenza ha raggiunto il 100%. Il fatto che in tali locali, al momento dell'introduzione dei suinetti sia stata rilevata una

contaminazione residua post-sanificazione, potrebbe essere alla base del netto aumento della prevalenza, suggerendo un ruolo importante dell'ambiente nel determinare la colonizzazione nasale nei soggetti naive. Nei locali di svezzamento e messa a terra si sono riscontrati i maggiori tassi di colonizzazione nasale e di campioni ambientali positivi. Nei reparti di ingrasso si assiste ad una diminuzione di entrambi i parametri. Resta da appurare se questa associazione possa essere estesa alla generalità degli allevamenti. Va tuttavia sottolineato che la diffusione della colonizzazione è avvenuta in corrispondenza dell'inizio dei trattamenti antibiotici per via orale, nonché della inclusione dell'ossido di zinco nel mangime. A tale proposito va ricordato che esistono evidenze del fatto che lo zinco possa fungere da agente selettivo per i ceppi MRSA (Aarestrup et al., 2010). Per quanto riguarda le informazioni scaturite dallo studio longitudinale si può ipotizzare, anche in relazione ad altri studi simili, che l'età e l'ambiente ed i trattamenti antibiotici giochino un ruolo rilevante nella epidemiologia di MRSA.

3.3 STUDIO SULLA PRESENZA DI MRSA AL MACELLO E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI ISOLATI IN ALLEVAMENTO ED AL MACELLO

MOTIVAZIONI DELLO STUDIO

Questo studio è stato realizzato per raccogliere informazioni aggiornate sui ceppi di MRSA presenti nell'allevamento suino in Italia. Come già ricordato nei precedenti capitoli, Battisti et al nel 2010 hanno pubblicato un lavoro attestante una notevole eterogeneità dei ceppi di MRSA rilevati nei suini al macello in Italia. Con questo studio si è voluto indagare se tale situazione fosse presente anche a livello di campioni ambientali di allevamento e se vi fosse una stretta correlazione fra ceppi isolati in allevamento e da suini al macello provenienti dallo stessa azienda.

MATERIALI E METODI

Allevamenti

Sono stati interessati 3 dei 6 allevamenti dello studio 1 ed altri 2 allevamenti a ciclo chiuso della Pianura Padana.

Tamponi ambientali in allevamento

Per gli allevamenti 1,2,3 sono stati utilizzati i campioni ambientali dello studio 1, per gli altri due (7 ed 8) è stato eseguito un campionamento identico.

Tamponi nasali al macello

Una partita proveniente da ciascun allevamento è stata oggetto di campionamento al macello. Da ogni partita sessanta tamponi nasali sono stati prelevati da suini immediatamente dopo la iugulazione. Alla fine della catena di macellazione, appena prima del sezionamento a caldo, garze sterili (Sodibox®) sono state strofinate sulla cute della regione della gola per valutare la contaminazione delle carcasse.

Analisi di laboratorio

Le metodiche colturali utilizzate sono state le medesime descritte per lo studio 1. I tamponi nasali sono stati analizzati in pool da 10 (6 pool per partita)

RISULTATI

Per quanto riguarda i tamponi nasali raccolti dopo iugulazione, 6 pool (100%) sono risultati positivi in quattro allevamenti, mentre in un allevamento il 50% (3/6) dei pool è risultato positivo. (grafico 5)

I campioni eseguiti tramite strofinamento della cute della regione della gola alla fine della catena di macellazione hanno mostrato percentuali di positività pari al 20% (allevamento 1), 45% (allevamento 2), 40% (allevamento 3), 60 % (allevamento 7) e 55% (allevamento 8). (grafico 6)

Grafico 5: Percentuali di positività dei pool di tamponi nasali al macello

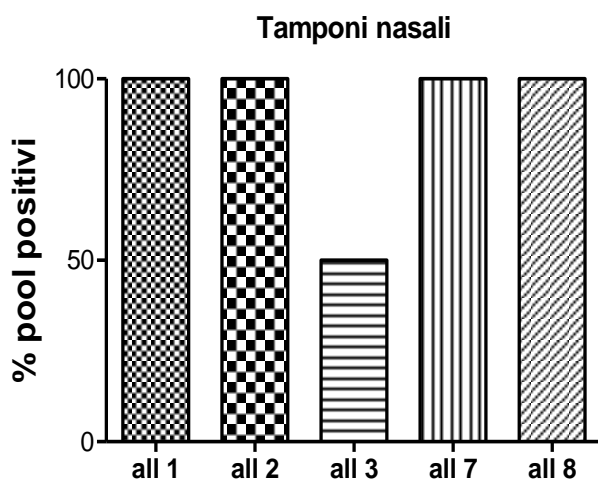
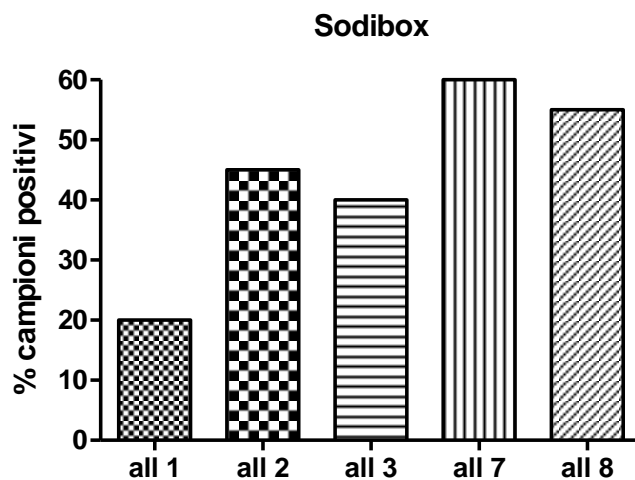


Grafico 6: Percentuali di positività dei sodibox strofinati sulla gola delle carcasse alla fine della linea di macellazione



Una selezione di ceppi isolati dall'ambiente o dalle narici di suini proveniente dai 5 allevamenti studiati sono stati sottoposti a genotipizzazione. Sono stati sottoposti a genotipizzazione anche ceppi isolati al macello (tamponi nasali o sodibox da carcasse a fine macellazione) da animali provenienti dagli stessi allevamenti. Le analisi, condotte dal Centro di Referenza Nazionale per l'Antibiotico Resistenza, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana hanno previsto la esecuzione della Multi-Locus Sequence Typing (MLST) (Enright et al.,2000) e del sequenziamento della regione X della proteina A (spa -typing, Harmsen et al.,2003), con classificazione mediante Ridom StaphType software (Ridom GmbH, Wurzburg, Germany)

Nella tabella 12 sono riportati ST e spa types riscontrati negli allevamenti.

Tabella 12: ST e spa types isolati in allevamento ed al macello

Allevamento	Ambiente allevamento	Tamponi nasali al macello	Carcasse al macello
1	ST398 t899	ST398 t899	ST398 t899
	ST398 t1939	ST398 t1939	ST398 t034
	ST1 t127	ST398 t011	
2	ST398 t1939	ST398 t899	ST398 t899
	ST398 t899		
	ST1 t127		
3	ST1 t127	ST398 t899	ST398 t899
	ST398 t1939	ST398 t1939	ST398 t1939
	ST398 t899		
7	ST398 t899	ST398 t899	ST398 t899
	ST398 t4132		ST398 t4132
8	ST398 t899	ST398 t2922	ST398 t899
	ST398 t2922	ST398 t899	

Grassetto: ceppo isolato con maggiore frequenza

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi condotta al macello, pur valutando animali provenienti da un numero limitato di partite, conferma che il tasso di animali che raggiungono il macello provenendo da allevamenti colonizzati è rilevante. Di notevole interesse appare il fatto che, a fine macellazione, il riscontro di MRSA sulle carcasse risulta tutt'altro che occasionale. Seppure ad oggi la trasmissione dal suino all'uomo tramite prodotti carni non sia stata dimostrata, ulteriori approfondimenti sul destino di questa contaminazione nella filiera meriterebbe ulteriori approfondimenti. Per quanto riguarda la genotipizzazione dei ceppi questi dati confermano la elevata eterogeneità dei ceppi evidenziata da Battisti et al (2010). In particolare da questo studio emerge che tale situazione è riscontrabile non solo al macello ma anche nell'ambiente di allevamento. In 3 allevamenti su 5 è stato infatti possibile evidenziare più di un ST ed in tutti e 5 gli allevamenti testati più di uno spa.

Di notevole interesse la dimostrazione della presenza di ST t127 negli ambienti di allevamento, ceppo considerato adattato all'uomo. Battisti et al (2010) avevano già descritto l'isolamento di tale ceppo da tamponi nasali di suini al macello. Nell'allevamento 3 tale ceppo è risultato quello maggiormente evidenziato a livello ambientale. Un altro aspetto interessante è l' evidenza della non completa sovrapposizione fra i ceppi isolati in allevamento e quelli isolati al macello. A questo proposito non è da escludere che la contaminazione di una partita di suini possa verificarsi sul mezzo di trasporto o nella stalle di sosta, così come già ampiamente dimostrato un altro importante agente zoonosico quale *Salmonella* (Gebreyes et al. 2004, Larsen et al., 2004, Magistrali et al., 2008). Per altro, in una recente pubblicazione Broens et al (2011), hanno dimostrato come questa evenienza sia possibile anche per MRSA.

CONCLUSIONI

Le attività di ricerca condotte e riportate negli studi sperimentali precedentemente esposti costituiscono a parere del Dottorando un utile approfondimento sulle conoscenze dell'epidemiologia di MRSA nelle fasi di produzione primaria del suino. Dallo studio sulla contaminazione ambientale è emerso che le operazioni di lavaggio e disinfezione (*C&D*) applicati negli allevamenti suinicoli sono in grado di ridurre la contaminazione ambientale da MRSA ma non di eliminarla. D'altronde, il risultato atteso di tali interventi è la riduzione della carica infettante ambientale piuttosto che la sterilizzazione degli ambienti. Assai rilevante appare il fatto che l'efficacia delle pratiche di *C&D* non sia risultata omogenea nelle diverse fasi ma si sia dimostrata significativamente superiore nelle sale parto rispetto alle altre strutture di allevamento. Nell'allevamento suinicolo convenzionale italiano il rigore e l'intensità con cui sono realizzate le operazioni di *C&D* è sicuramente superiore nelle sale parto, pertanto, si può concludere che una rigorosa applicazione di tali operazioni potrebbe ridurre il *challenge* ambientale a cui sono esposti gli animali nei nostri allevamenti. Un altro risultato importante di questo primo studio è stato quello di evidenziare come il livello di contaminazione degli ambienti di allevamento non sia omogeneo in quanto, nelle fasi di ingrasso, il livello del *challenge* ambientale diminuisce rispetto alle prime fasi di accrescimento. Il motivo di questo andamento non appare chiaro anche se è possibile ipotizzare una relazione con la pressione selettiva esercitata dai trattamenti antibiotici che tende a diminuire in modo ragguardevole con l'avanzare dell'età degli animali. Lo studio longitudinale, nel quale la contaminazione degli ambienti è stata studiata parallelamente alla colonizzazione nasale degli animali, ha fornito ulteriori spunti di riflessione. In particolare, si è registrato un andamento sovrapponibile fra il tasso di portatori nasali ed il tasso di campioni ambientali positivi. Inoltre, è stato rilevato un drastico aumento del numero dei portatori nasali fra la fase sottoscrofa e la fine del periodo di svezzamento. Tale rapida diffusione della colonizzazione nasale è risultata coincidente con due fattori: 1) lo spostamento degli animali da un ambiente negativo per MRSA ad un reparto di svezzamento contaminato pur se sottoposto a *C&D*, 2) la somministrazione di medicazioni antibiotiche per via orale. Il numero di soggetti portatori a livello nasale si è mantenuto a livelli elevatissimi (fino al 100% dei testati) per tutto il periodo coincidente con questa

pratica terapeutica e si è ridotto drasticamente (attorno al 20%) dopo l'interruzione delle medicazioni orali, nei reparti di ingrasso. Questi risultati permettono di formulare le conclusioni che l'ambiente contaminato possa fungere da punto di partenza per la diffusione della colonizzazione di un gruppo e che l'effetto della pressione selettiva dei trattamenti di massa sia tutt'altro che trascurabile. Oltre quanto già esposto circa dell'importanza dell'applicazione rigorosa delle operazioni di C&D, appare quindi evidente che il tasso dei soggetti portatori potrebbe essere contenuto se i trattamenti di massa fossero ridotti e limitati allo stretto necessario. Lo studio che ha coinvolto alcuni allevamenti e gli animali da essi provenienti in fase di macellazione ha permesso di confermare quanto evidenziato da Battisti *et al* (2010) circa una elevata positività in termini di colonizzazione nasale delle partite di suini macellati. Infatti, tutti i 5 allevamenti (di cui era già noto lo stato di positività per MRSA) hanno dato origine a partite colonizzate. Un risultato meno atteso è stato quello riguardante la percentuale di carcasse che sono risultate contaminate alla fine della catena di macellazione, da un minimo del 20% ad un massimo del 60%, a seconda delle partite. Da ciò appare evidente che la macellazione di partite colonizzate dà origine a carcasse contaminate. Le tipizzazioni biomolecolari sui ceppi isolati in quest'ultimo studio hanno confermato la notevole eterogeneità dei ceppi di MRSA diffusi nell'allevamento suinicolo italiano. Infatti, accanto al predominante ST 398, tipicamente associato al suino e ad altre specie di animali da reddito, è stata confermata la presenza di altri ST fra cui ST1, ritenuto fino a poco tempo fa strettamente adattato all'uomo. È inoltre emerso come taluni ceppi riscontrati nei suini macellati non siano fra quelli rinvenuti negli allevamenti di origine. L'importanza dell'igiene in tutte le fasi post allevamento (trasporto, permanenza nelle stalle di sosta, macellazione) è nota ed ampiamente documentata per altri importanti agenti batterici trasmissibili dal suino all'uomo, in particolare per *Salmonella*. I risultati di questo lavoro permettono di ipotizzare, parimenti, un ruolo di tali fasi sulla contaminazione finale da MRSA delle carcasse. Seppure ad oggi la trasmissione dal suino all'uomo tramite prodotti carnei non sia stata dimostrata, ulteriori approfondimenti sul destino di questa contaminazione nella filiera meriterebbe ulteriori approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

Aarestrup FM., Cavaco L., Hasman H., (2010). Decreased susceptibility to zinc chloride is associated to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CCT398 in Danish swine. *Veterinary Microbiology* 142:455-457.

Aires-de-Sousa M., Parente CE., Vieira-da-Motta O., Bonna IC., Silva DA., de Lencastre H., (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 73:3845-3849.

Armand-Lefevre L., Ruimy R., Andremont A., (2005). Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human control, and pigs. *Emerging Infectious Diseases*. 11:711-714.

Bates, D. Maechler, M., Bolker, B., 2012. lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999999-0 (<http://lme4.r-forge.r-project.org/>)

Battisti A., Franco A., Merialdi G., Hasman H., Iurescia M., Lorenzetti R., Feltrin F., Zini M., Aarestrup F.M., 2010. Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Veterinary Microbiology*. 19, 361-366.

Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M., (1948). Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet*. ii:641-644.

Bens CC., Voss A., Klassen CH., (2006). Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:1875-1876.

Blaha T., Cuny C., Witte W., Meemken D., (2008). Occurrence of MRSA in humans occupationally exposed to pigs in the northwest of Germany. International Pig Veterinary Society Annual Conference, Durban, South Africa.

Brakstad O., Aasbakk K., Maeland J.A., (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* gene. Journal of Clinical Microbiology 30, 1654-1660.

Broens, E.M., Graat, E.A., Engel, B., van Oosterom, R.A., van de Giessen, A.W., van der Wolf, P.J., 2011 (a). Comparison of sampling methods used for MRSA-classification of herds with breeding pigs. Veterinary Microbiology 147, 440-444.

Broens EM., Graat EA., van der Wolf PJ., van de Giessen A.W., De Jong M.C., 2011(b). Transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among pigs during transportation from farm to abattoir. The Veterinary Journal, 189, 302-305.

Broens EM., Graat EA., van der Wolf PJ., van de Giessen AW. van Duijkeren E., Wagenaar JA., van Nes A., Mevius DJ., de Jong MC., 2011(c). MRSA CC398 in the pig production chain. Prev. Vet. Med., 1;98(2-3):182-189.

Broens, E.M., Espinosa-Gongora, C., Graat, E.A., Vendrig, N., Van Der Wolf, P.J, Guardabassi, L, Butaye, P, Nielsen, J.P, De Jong, M.C., Van De Giessen, A.W., 2012. Longitudinal study on transmission of MRSA CC398 within pig herds. BMC Veterinary Research, 8, 58.

Cui L., Murakami H., Kuwahara-Arai K., Hanaki H., Hiramatsu K., (2000). Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. Antimicrob Agents Chemother. 44:2276-2285.

Cui S., Li J., Hu C., Jin S., (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J Antimicrob Chemother.* 64:680-683.

Couto LH., de Lencastre H., Severina E., Kloos W., Webstr JA., Hubner RJ., Sanches IS., Tomasz A., (1996). Ubiquitous presence of *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist.* 2:377-391.

Cuny C., Friedrich A., Kozytska S., Layer F., Nubel U., Ohlsen K., Strommenger B., Walther B., Wieler L., Witte W., (2010). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 109-117

DANMAP 2005. DANMAP 2004-use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and human in Denmark. Copenhagen, Denmark.

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis J.T., Wit B., (2008). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 52–56.

Declercq P., Petre D., Gordts B., Voss A., (2008). Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin. *Infection.* 36:590-592.

de Neeling AJ., van den Broek MJM., Splaburg EC., van Santen-Verheuevel MG., Dam-Deisz WDC., Boshuizen HC., van de Giessen AW., van Duijkeren E., Huijsdens XW (2007). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology* 122,366-372.

Denis O, Suetens C, Hallin M, Catry B, Ramboer I, Dispas M., (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*. 15:1098–101.

Deurenberg RH, Stobberingh EE., (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection. Genet Evol.* 8:747-63.

Devriese LA., van Damme LR., Fameree L., (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zenbtl Vetmed Reihe B*. 19:598-605.

Devriese LA., (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* isolated from animal species. *J Appl Bacteriol.* 56:215-220.

EFSA, 2007. Report of the task force on zoonoses data collection on a proposal for technical specifications for a baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in breeding pigs. *The EFSA Journal* 129, 1-14.

EFSA (2009a). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal*. 993, 1-73.

EFSA (2009b). Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: MRSA prevalence estimates; on request from the European Commission. *The EFSA Journal*. 7:1376.

EFSA (2009c). Food safety aspects of dairy cow housing and husbandry systems Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal* 1189:1-27.

EFSA (2010). Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part B: factors associated with MRSA contamination of holdings: on request from the European Commission. The EFSA Journal. 8:1597.

de Neeling, A.J., van den Broek., M.J.M., Splaburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D.C., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens X.W., 2007. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Veterinary Microbiology 122, 366-372.

Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 1008–1015.

Fanoy E., Helmhout LC., van der Vaart WL., Weijdem K., (2009). An outbreak of non-typeable MRSA within a residential care facility. Euro Surveillance. 14:pii:19080.

Farzana K., Shah S., Jabben F., (2004). Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. Journal of Research (Science). 15, 145-151.

Frenay HM., Bunschoten AE., Scouls LM., van Leewen WJ., Vandenbroucke-Grauls CM., (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 15:60-64.

Gebreyes WA., Davies PR, Rurkson Pk, Morrow WE, Funk JA, Altier C. 2004. *Salmonella enterica* serovars from pigs on farms and after slaughter and validity of using bacteriologic data to define herd *Salmonella* status. Journal of Food Protection, 67: 691-697

Gonzales BE., Rueda AM., Shelburne SA., Musher DM., Hamill RJ., Hulten KG., (2006). Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infection. *Control Hosp Epidemiol.* 27:1051-1056.

Gortel K, Campbell KL, Kakoma I, Whittam T, Schaeffer DJ, Weisiger RM., (1999). Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. *Am J Vet Res.* 60:1526-30.

Guardabassi L., Stegger M., Skov R., (2007). Retrospective detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *Vet Microbiol.* 122,384-386.

Hanselman BA., Kruth SA., Rousseau J., Low DE., (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. *Emerg Infect Dis.* 12:1933-1938.

Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D., Vogel, U., 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5442–5448.

Hartmann MS., Trostle SS., Klohn AA., (1997). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a post-operative wound infection in a horse. *J Am Vet Assoc.* 211:590-592.

Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover FC., (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 40:135-136.

Huijsdens XW., van Dijke BJ., Spalburg E., van Santen-Verheuevel MG., Heck MEOC., Pluister GN., Voss A., Wannet WJB., de Neeling AJ., (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 26.

Ito T., Katayama Y., Hiramatsu K., (1999). Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:1449-1458.

Jones TF., Kellum ME., Porter SS., Bell M., Schaffner W., (2002). An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 8, 82-84.

Kaszanyitzky EJ., Janosi S., Egyed Z., Agost G., Semjen G., (2003). Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. *Acta Vet Hung.* 51, 451-464.

Kaszanyitzky EJ., Egyed Z., Janosi S., Keseru J., Gal Z., Szabo I., Veres Z., Somogyi P., (2004) Staphylococci isolate from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to β -lactamase-resistant β -lactam antibiotics. *Acta Vet Hung.* 52, 7-17.

Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K., (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1955-1963.

Kerouaton A., Hennekinne JA., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., de Buyser ML., (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol.* 115, 369-375.

Khanna T., Frienship R., Dewey C., Weese JS., (2008). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol.* 128, 298-303.

Kitai S., Shimizu A., Kawano J., Sato E., Nakano C., Uji T., Kitagawa H., (2005). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *J Vet Med Sci.*67, 107-110.

Klevens RM., Edwards JR., Tenover FC., McDonald LC., Horan T., Gaynes R., and National Nosocomial Infections Surveillance System (2006). Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care in US hospitals. *Clin Infect Dis.* 42:389-391.

Kluytmans J., van Leeuwen W., Goessens W., Hollis R., Messer S., Herwaldt L., Bruining H., Heek M., Rost J., van Leeuwen N., (1995). Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J Clin Microbiol.* 33, 1121-1128.

Kwon NH., Park KT., Jung WK., Youn HY., Lee Y., Kim SH., Bae W., Lim JY., Kim JY., Kim JM., Hong SK., Park YH., (2006). Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Vet Microbiol.* 117, 304-312.

Kock R., Harlizius J., Bressan N., Laerberg R (2009). Prevalence and molecular characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pig on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis.* 28:1375-1382.

Larsen ST, Hurd HS, McKean JD, Griffith RW., Wesley IV 2004. Effect of short term lairage on the prevalence of *Salmonella enterica* in cull sows. *Journal of Food Protection*, 67:1489-1493

Lee JH., (2003) Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol.* 69, 6489-6494.

Li XZ., Mehrotra M., Ghimire S., Adewoye L., (2007). β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 121, 197-214.

Lopez M., Lozano C., Perez V., Martinez S., del Campo C., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Torres C., (2008). Detección de *Enterococcus faecium* van B2 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en alimentos de origen animal. Congreso Nacional de La sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Madrid, Spain.

Lozano C., Lopez M., Gomez-Sanz E., Ruiz-Larrea F., (2009). Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST 398 in food samples of animal origin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 64:1325-1326.

Nakagawa, S., Schielzeth, H., 2010. Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: a practical guide for biologists. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85:935-956.

Magistrali C., Dionisi AM, De Curtis P., Cucco L, Vischi O, Scuto S, Zicavo A, Pezzotti G. 2008. Contamination of *Salmonella* spp in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Research in Veterinary Science*, 85:204-207

Meyer M., (1967). A proposal for subdividing the species *Staphylococcus aureus*. *Int J Syst Bacteriol.* 17:387-389.

Musser JM., Ma RKS., (1990). Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. In: Novik R.P. (Ed) Molecular biology of the Staphylococci VCH, New York, pp59-67.

Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia NC., Parisi A., Greco G., Bellacicco AL., Virgilio S., Celano GV., (2007). methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int J Food Microbiol. 117, 219-222.

Pan A., Battisti A., Zoncada A., Bernieri F., Boldini M., Franco A, Giorgi M., Iurescia M., Lorenzotti S., Martiniotti M., Monaci M., Pantosti A., (2009). Community-acquired methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy. Emerg Infect Dis. 15,845-847.

Pu S., Han F., Ge B., (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. Appl Environ Microbiol 75, 265–267.

Prescott JF., Baggot JD., Walker RD., (2000) Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine, third ed. Iowa University Press, Iowa, USA.

Quddoumi S., Bdour S., Mahasneh A., (2006). Isolation and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from livestock and poultry meats. Annals of Microbiology. 56, 155-161.

R Core Team, R, 2012: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012, ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org/>.

Regolamento (CE) n.2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari GU L338 del 22.12.2005.

Seguin JC, Walker RD, Caron JP, Kloos WE, George CG, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA., (1999). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J Clin Microbiol.* 37:1459-63.

Sergio DMB., Koh TH., Hsu L., Ogden BE., Goh ALH., Chow PKH., (2007). Investigation of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *J Med Microbiol.* 56, 1107-1109.

Shinamura Y., Kidokoro S., Murata M., (2006). Survey and properties of *Staphylococcus aureus* from Japanese-style desserts. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 70, 1571-1577.

Smith TC., Harper MJ., Moritz-Korolov E., Kroeger JS., Diekema DJ., Herwaldt L., (2008). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in the Midwestern United States. International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, USA Abstract.

Smith TC., Male MJ., Harper AL., Kroeger JS., Tinkler GP., Moritz ED., Capuano AW., Herwaldt LA., Diekema DJ., (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE*, 4, 1-6.

Soavi L., Stellini R., Signorini L., Antonimi B., (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398, Italy. *Emerg Infect Dis.* 16:346-348.

Stegemann MR., Passmore CA., Sherington J., Lindeman CJ., Papp G., Weigel DJ., Skogerboe TL., (2006). Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new extended-spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:2286-2292.

Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W., (2003). Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. J. Clin Microbiol. 41, 4089-4094.

Tsubakishita S., Kuwahara-Arai K., Sasaki T., Hiramatsu K., (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin-resistance in Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 54:4352-4359.

van Belkum A., Melles DC., Peeters JK., van Leeuwen WB., (2008). Methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. Emerg Infect Dis, 14:479-483.

van Cleef BA., Graveland H., Haenen AP., van de Giessen AW., Heederik D., Wagenaar JA., Kluytmans JA., (2011). Persistence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in field workers after short-term occupational exposure to pigs and veal calves. J Clin Microbiol. 49:1030-3.

van Cleef BA., Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M, Zemlickova H, Skov RL, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Friedrich AW, Spiliopoulou I, Pászti J, Hardardottir H, Rossney A, Pan A, Pantosti A, Borg M, Grundmann H, Mueller-Premru M, Olsson-Liljequist B, Widmer A, Harbarth S, Schweiger A, Unal S, Kluytmans JA. (2011). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. Emerg Infect Dis. 17:502-5.

van Loo I.H.M., Diederren B.M.W., Savelkoul P.H.M., Woudenberg J.H.C., Roosendaal R., van Belkum A., Lemmens-den Toom N., Verhulst C., van Keulen P.H.J., Kluytmans J.A.J.W (2007). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 13,1753-1755.

van Rijen M.V., Keulen P.V., Kluytmans J., (2007).. Increase of pig and calf MRSA in a Dutch hospital. *Clin Microbiol Infect.* 13, S446-S447.

van Rijen MM., van Keulen PH., Kluytmans JA (2008). Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clin Infect Dis.* 46:261-263.

Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M., (2005). Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis*, 11, 1965-1966.

Wagenaar JA., Yue H., Pritchard J., Broekhuizen-Stins M., (2009). Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol.* 139:405-409.

Walsh TR., Howe RA., (2002). The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 56:657-675.

Weese JS., Archambault M., Willey BM., Hearn P., Kreiswirth BN., Said-Salim B., McGeer A., Likhoshvay Y., Prescott JF., Low DE., (2005). Methicillin-resistat *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. *Emerg Infect Dis.* 11:430-435.

Weese JS., Caldwell F., Willey BM., Kreiswirth BN., McGeer A., Rousseau J., Low DE., (2006). An outbreak of Methicillin-resistat *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. *Vet Microbiol.* 16:160-164.

Weese JS., Zwambag A., Rosendal T., Reid-Smiyh R., Friendship R., (2010a). Longitudinal investigation on Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in piglets. *Zoonoses and Public Health*, 1-6.

Weese JS., Reid-Smiyh R., Rousseau J., Avery B., (2010b). Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* contamination of retail pork. CVJ, 51: 749-752.

Witte W., Hummel R., Meyer W., Exner H., Wundrak R., (1977). On the ecology of *Staphylococcus aureus*: characterization of strains from chicken. A Allg Mikrobiol. 17:639-644.

Witte W., Strommenger B., Stanek C., Cuny C., (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. Emerg Infect Dis. 13:255-258.

Wulf M., van Nes A., Eikelenboom-Boskamp A., de Vriese J., (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary doctors and students, The Netherlands. Emerg Infect Dis. 12:1939-1941.

Wulf M., Voss A., (2008). MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen?. Clin Microbiol Infect. 14:519-521.

Wulf M., Sorum M., van Nes A., Skov R., Melchers WJ., Klaassen CH., (2008). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. Clin Microbiol Infect 14:29-34.

Yamamoto T., Nishiyama A., Tanako T., Yabe S., Higuchi W., Razvina O., Shi D., (2010). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis and drug resistance. J Infect Chemother 16:225-254.

CAPITOLO 4

ATTIVITA' DI RICERCA E PUBBLICAZIONE

Nel corso del periodo in cui ha svolto la sua attività di Dottorando presso l'Università di Parma, il Dr. Giuseppe Merialdi ha condotto una intensa di ricerca presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. In particolare ha partecipato ai seguenti progetti:

Responsabile scientifico del Progetto di Ricerca Corrente 2010 del Ministero della Salute “Valutazione del potenziale tossigeno di *Clostridium botulinum* nel Prosciutto crudo”

Responsabile di unità operativa del Progetto di Ricerca EMIDA-ERANET 2010 “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in primary productions; multi-host pathogen, spill-over and spill-back between animals and humans?”

Responsabile scientifico del progetto di ricerca autofinanziato IZSLER 2011 “Epidemiologia molecolare dell'infezione da *Brachyspira hyodysenteriae* con particolare riferimento ai ceppi multi resistenti”

Responsabile di unità operativa del progetto “Studio di un sistema di individuazione precoce delle malattie rilevanti per la salute pubbliche, presenti (endemiche” o di nuova introduzione nella fauna selvatica della Regione Emilia Romagna e definizione delle procedure di sorveglianza standardizzate basate sul rischio”. Progetto Finanziato da Regione Emilia Romagna, esercizio 2012

Responsabile di unità Operativa del progetto “Diarrea emorragica da *E. coli* produttori di Shiga-Like Toxin e Sindrome Emolitica Uremica: epidemiologia, caratteristiche di

virulenza e fattori di rischio nella Regione Emilia-Romagna”. Progetto Finanziato da Regione Emilia Romagna, esercizio 2012.

Partecipazione a congressi

Durante il periodo di Dottorato Il Dr Giuseppe Merialdi ha partecipato a numerosi convegni dei quali sono elencati di seguito i più rilevanti:

21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, July 18-21, 2010, Vancouver, Canada.

2nd European Symposium of Porcine Health Management, 26-28 May 2010, Hannover, Germany

9th Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association, Vlieland, The Netherlands, September 13-16 2010.

3rd European Symposium of Porcine Health Management, May 25th-27th, 2011. Dipoli Congress Center, Espoo, Finland

4th European Symposium of Porcine Health Management, April 25th-27th, 2012. Bruges, Belgium.

Pubblicazioni

Durante il periodo considerato il Dr. Giuseppe Merialdi ha partecipato come autore e coautore a numerose pubblicazioni (peer reviewed papers, pubblicazioni su atti di convegni nazionali ed internazionali. I lavori in evidenziati in grassetto sono quelli pertinenti con le attività di Ricerca del Dottorato.

Pubblicazioni su atti di convegni nazionali

1. Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M. Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da campioni patologici. Atti XXXVI Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed allevamento dei suini, 25-26 Marzo 2010, Montichiari (BS), pp205-211

2. Magistrali C.F., Cucco L., D'Avino N., D'Angelo G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Merialdi G. - Valutazione della sensibilit  ad antimicrobici di *B.hydysenteriae*: confronto tra due metodi. Atti XXXVI Meeting Annuale Societ  Italiana di Patologia ed allevamento dei suini, 25-26 Marzo 2010, Montichiari (BS), pp337-340
3. Merialdi G., Spaggiari B., Santachiara F., Bardasi L., Fontana M.C., Licata E., Barbani R., Pozio E. First record of *Trichinella pseudospiralis* in a wild boar (*Sus scrofa*) of Italy. Atti XXVI Congresso Nazionale Societ  Italiana di Parassitologia, Perugia 22-25 Giugno 2010, Parassitologia 52, 2010, p.282.
4. Maioli G., Bonilauri P., Merialdi G., Luppi A., Dottori M. Surveillance on TBEV and CCHFV in ticks collected on hunted wild animals in the Emilia Romagna region (Italy), preliminary results. Atti XXVI Congresso Nazionale Societ  Italiana di Parassitologia, Perugia 22-25 Giugno 2010, Parassitologia 52, 2010, p.277.
5. Maioli G., Fontana M.C., Zanin D., Rugna G., Renzi M, Merialdi G. Cluster of cysticercosis (*Taenia pisiformis*) in European Brown Hares in Bologna Province. Atti XXVI Congresso Nazionale Societ  Italiana di Parassitologia, Perugia 22-25 Giugno 2010, Parassitologia 52, 2010, p.27
6. **Galletti E. , Merialdi G., Rosignoli C., Mazzaro A., Alborali G., Grassi A., Zanoni MG., Granito G. , Guerzoni S. , Arioli E. , Zavattini S. , Franco A., Bonilauri P., Martelli P. Persistenza di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti negli ambienti di allevamento dopo pulizia e sanificazione e sulle carcasse suine a fine macellazione. Atti XXXVII Meeting Annuale Societ  Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 24-25 Marzo 2011, Piacenza, 177-184**
7. Rugna G., Bonilauri P., Frasnelli M., Garbarino C., Gelmetti D., Grazioli S., Licata E., Massi P., Pacciarini M.L., Pongolini S., Tamba M. Sozzi E., Vicari N., Merialdi G. Monitoraggio sanitario della popolazione di cinghiale (*Sus scrofa*) in Emilia Romagna. Risultati degli anni 2006-2010. Atti XXXVII Meeting Annuale Societ  Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 24-25 Marzo 2011, Piacenza, 185-195.
8. Iodice G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Maioli G., Dottori M., Merialdi G., Leonelli R., Merenda M., Biasi G., Luppi A. Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati dal suino nel Nord Italia: aggiornamento dei risultati. Atti XXXVII Meeting Annuale Societ  Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 24-25 Marzo 2011, Piacenza, 196-202.

9. Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Dottori M. Griglia SPES: aggiornamenti sul monitoraggio delle lesioni pleuriche in suini macellati. Atti XXXVII Meeting Annuale Società Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 24-25 Marzo 2011, Piacenza, 306-311.
10. Ostanello F., Granito G., Rugna G., Lelli D., Leotti G., Merialdi G., Bianchi M. Valutazione sierologica dell'efficacia di un vaccino anti PCV2. Atti XXXVII Meeting Annuale Società Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 24-25 Marzo 2011, Piacenza, 333-341.
11. Rugna G., Cevidalli A., D'Incau M., Merialdi G. Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) di 18 antibiotici nei confronti di *Salmonella Choleraesuis*. Atti XXXVII Meeting Annuale Società Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 24-25 Marzo 2011, Piacenza, 357-361.
12. Calisesi L., Luppi A., Bianchi M., Sarli G., Gelmetti D., Morandi F., Bonilauri P., Dottori M., Merialdi G. Descrizione di un focolaio di encefalomiocardite in un allevamento suino. . Atti XXXVII Meeting Annuale Società Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 24-25 Marzo 2011, Piacenza, 243-249
13. **Merialdi G., E. Galletti, G. Granito, A. Franco, A. Battisti, and P. Martelli P 2011: Studio longitudinale sulla colonizzazione nasale da *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) in un allevamento a ciclo chiuso. Atti del XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., pp. 50-51**
14. Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Maioli G., Biasi G., Dottori M., Merialdi G. Resistenza agli antibiotici di ceppi di *Escherichia coli* F4+ isolati dal suino nel periodo 2002-2011. Atti XXXVIII Meeting Annuale Società Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 22-23 Marzo 2012, Parma, 160-168
15. Ardigò P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis F., Luppi A., Gherpelli Y., Merialdi G., Volta A., Gnudi G., Saleri R. Borghetti P., Martelli P. Studio delle manifestazioni cliniche, delle modificazioni anatomiche e del pattern infiammatorio citochinico nel liquido bronco alveolare in suini affetti da malattia respiratoria acuta spontanea da *Actinobacillus pleuropneumoniae*: implicazioni terapeutiche. Atti XXXVIII Meeting Annuale Società Italiana di patologia ed Allevamento dei suini, 22-23 Marzo 2012, Parma, 187-204.

Pubbilcazioni su atti di convegni internazionali

1. Merialdi G., Fontana M.C., Spaggiari B. Tallarico N., Turci S., Leonelli R., Galletti G., Vincenzi E., Rugna G., P. Bonilauri (2010). Effect of pre-

- slaughter diet integration with a protected source of formiate and citric acid on the prevalence of *Salmonella* spp. carrier pigs at slaughter. Proc. 2nd European Symposium on Porcine Health Management, 26-28 May 2010, Hannover, Germany, p. 149.
2. Luppi A., Bonilauri P., Ferarri E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M., Martelli P. Serological characterizazion of *Haemophilus parasuis* strains in Italy. Proc. 2nd European Symposium on Porcine Health Management, 26-28 May 2010, Hannover, Germany, p. 116
 3. Luppi A., Arioli E., Caleffi A., Bonilauri P., Merialdi G., Maioli G., Dottori M., Marco E., Martelli P. SPES grid and *Actinobacillus pleuropneumoniae* eradication in a pig herd. Proc. 2nd European Symposium on Porcine Health Management, 26-28 May 2010, Hannover, Germany, p. 116
 4. Magistrali C., Cucco L., D'Angelo G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Merialdi G. Comparison between two different methods for antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira hyodysenteriae*. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, July 18-21, 2010, Vancouver, Canada, Vol. 2, p 735.
 5. Luppi A., Iodice G., Franchi F., Bonilauri P., Merialdi G., Merenda M., Dottori M., Simultaneous infection by serotypes 4 nad 12 of *Haemophilus parasuis* in a swine herd: a clinical case. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, July 18-21, 2010, Vancouver, Canada, Vol. 2, p 826
 6. Galletti E., Merialdi G., Antonelli A., Brini E., Fusaro L., Sarli G., Fontana M.C., Spaggiari B., Martelli P., Isoimmune thrombocytopenic purpura in newborn piglets: a case report. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, July 18-21, 2010, Vancouver, Canada, Vol. 2, p 909.
 7. Bosi P., Merialdi G., Bardasi L., Scandurra S., Vecchi M., Ferro P., Messori S., Nisi I., Casini L., Trevisi P. Effect of three different antibiotics on commensal intestinal microflora and on some productive traits of weaning piglets. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, July 18-21, 2010, Vancouver, Canada, Vol. 2, p 1029.
 8. Battisti A., Franco A., Hasman H., Iurescia M., Lorenzetti R., Feltrin F., Zini M., Aarestrup F. M., Merialdi G. Survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Italian pig finishing holdings. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, July 18-21, 2010, Vancouver, Canada, Vol. 2, p 791.

9. Galletti E., Bonilauri P., Bardasi L., Fontana M.C., Ramini M., Renzi M., Merialdi G. A new Taqman MGB Real Time PCR for the quantification and monitoring of canine leishmaniasis. Abstracts Proceedings Congress of the European Association of Veterinary Diagnosticians, 15 – 17 September 2010, Lelystad, the Netherlands, P-2-09
10. Bardasi L., Spaggiari B., Galletti E., Gamberini R., Scullin G., Giommi E., Fontana M.C., Galletti G., Merialdi G.. Comparison between ISO 6579:2002 and ISO 6579:2002/AMD 1:2007 for the detection of *Salmonella* spp in poultry carcasses. Abstracts Proceedings Congress of the European Association of Veterinary Diagnosticians, 15 – 17 September 2010, Lelystad, the Netherlands, P-1-06.
11. Gianluca Rugna, Brunella Spaggiari, Santina Grazioli, Elio Licata, Enrica Sozzi, Marco Tamba. Wild boar population monitoring program in Emilia Romagna region (Italy):results of years 2006-2009. Proceedings of the 9th Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association, Vlieland, The Netherlands, 13-16 Settembre 2010, p. 108
12. Spaggiari S., Rugna G., Licata E., Frasnelli M., Barigazzi G., Gelmini L., Massi P., Renzi M., Ricchi M., Merialdi G. Wildlife fauna monitoring plan in Emilia Romagna: health status of Roe Deer (*Capreolus capreolus*) population. . Proceedings of the 9th Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association, Vlieland, The Netherlands, 13-16 Settembre 2010, p. 109.
13. Maioli G., Fontana M.C., Zanin D., Rugna G., Renzi M, Merialdi G. Cluster of cysticercosis (*Taenia pisiformis*) in European Brown Hares in Norther Italy Proceedings of the 9th Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association, Vlieland, The Netherlands, 13-16 Settembre 2010, p. 61.
14. Drigo I., Agnoletti F., Bonci M., Merialdi G., Spigaglia P., Bano L. “*Clostridium difficile* survey in Italian piggeries and molecular characterization of isolates”. Prato Conference on the pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, Prato, Italy, 6-9 October, 2010.
15. Ostanello F., Granito g., Rugna G., Lelli D., Leotti G., Merialdi G. Agreement of dam and piglet PCV” ELISA titres. Proceedings of 3rd European Symposium of Porcine Health Management, May 25th-27th, 2011. Dipoli Congress Center, Espoo, Finland, p.145
16. Rugna G., Meriali G., Cevidalli A.E., D’Incau M. Evaluation of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 18 antibiotics against *Salmonella* Choleraesuis. Proceedings of 3rd European Symposium of Porcine Health Management, May 25th-27th, 2011. Dipoli Congress Center, Espoo, Finland, p.153

17. Rugna G., Merialdi G., Freasnelli M., Garbarino C., Graziolo S., Licata E., Luppi A., Sozzi E., Tamba M., Martelli P. Five years (2006-2010) results of wild boar (*Sus scrofa*) sanitary monitoring in Emilia-Romagna region (Northern Italy). Proceedings of 3rd European Symposium of Porcine Health Management, May 25th-27th, 2011. Dipoli Congress Center, Espoo, Finland, p.154
- 18. Galletti E., Merialdi G., Rosignoli C., Zanoni M.G., Grassi A., Franco A., Guerzoni S., Mazzaro A., Martelli P. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on pig carcasses surface at the end of the slaughtering process. Proceedings of 3rd European Symposium of Porcine Health Management, May 25th-27th, 2011. Dipoli Congress Center, Espoo, Finland, p.162**
- 19. Merialdi G., Galletti E., Rosignoli C., Alborali G., Giacomini E., Battisti A., Granito G., Mazzaro A., Martelli P. Persistence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) after cleaning and disinfection procedures in pig holdings. Proceedings of 3rd European Symposium of Porcine Health Management, May 25th-27th, 2011. Dipoli Congress Center, Espoo, Finland, p.96**
20. Maioli G, Balzani A, Licata E, Merialdi G, Defilippo F, Calzolari M, Gelmini M, Luppi A, Bianchi A, Dottori M. Geographical distribution of tick infesting wild hunted animals in Northern Italy : three years of data collection. 7th Ticks and Tick-borne pathogens International Conference : August 28th to September 2nd, 2011 Zaragoza (Spain) p 204-205
21. Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Maioli G., Dottori M., Rugna G., Merialdi G., Martelli P. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* F4+ strains isolated from swine in the period 2008-2011. Proceedings of 4th European Symposium of Porcine Health Management, April 25th-27th, 2012. Bruges, Belgium, p.97
- 22. Merialdi G., Galletti E., Rugna G., Granito G., Franco A., Battisti A., Luppi A., Martelli P. Longitudinal study on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal colonization in a farrow to finish pig herd. Proceedings of 4th European Symposium of Porcine Health Management, April 25th-27th, 2012. Bruges, Belgium, p. 100**
23. Rugna G., Merialdi G., Renzi M., Galletti E., Luppi A., Moscardini E., Martelli P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild boar and finishing swine in Northern Italy. Proceedings of 4th European Symposium of Porcine Health Management, April 25th-27th, 2012. Bruges, Belgium, p. 132
24. Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Merialdi G., Maioli G., Biasi G., Dottori M. Antimicrobial resistance of swine *Escherichia coli* F4+ strains isolated in

Italy from 2002 to 2011. Proceedings oral presentations 22nd IPVS 2012 KOREA pag.79

25. E. Carra, P. Bonilauri, F. Bergamini¹, G. Biasi, F. Corpus, C. Magistrali, A. Luppi, Y. Gherpelli, G. Rugna, M. Dottori, G. Merialdi Multilocus sequence typing analysis of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian farms. Proceedings oral presentations 22nd IPVS 2012 KOREA pag. 237

Publicazioni su riviste internazionali indicizzate

1. Battisti A., Franco A., Merialdi G., Hasman H., Iurescia M., Lorenzetti R., Feltrin F., Zini M., Aarestrup F.M. (2010). Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Veterinary Microbiology*, 2010 May 19;142(3-4):361-6
2. Mazzoni M., Merialdi G., Sarli G., Trevisi P., Bosi P., (2010). Effect of two doses of different zinc sources (inorganic vs. chelated form) on the epithelial proliferative activity and the apoptotic index of intestinal mucosa of early-weaned pigs orally challenged with *E. coli* K88. *Asian Australian Journal of Animal Science*, 23, 6, 777-785
3. Merialdi G., Bardasi L., Fontana M.C., Spaggiari B., Maioli G., Conedera G., Vio D., Londero M., Marucci G., Ludovisi A., Pozio E., Capelli G. (2011). First reports of *Trichinella pseudospiralis* in wild boars of Italy. *Veterinary Parasitology*, 10, 178: 370-3
4. Galletti E., Bonilauri P., Bardasi L., Fontana M. C., Ramini M., Renzi M., Dosa G., Merialdi G. (2011). Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Research in Veterinary Science*, Oct;91(2):243-5
5. Trevisi P., Casini L., Coloretto F., Mazzoni M., Merialdi G., Bosi P. (2011). Dietary addition of *Lactobacillus rhamnosus* GG impairs the health of *Escherichia coli* F4-challenged piglets. *Animal*, 5:9, 1354-1360
6. Bosi P., Merialdi G., Scandurra S., Messori S., Bardasi L., Nisi I., Russo D., Casini L., Trevisi P. (2011). Feed supplemented with three different antibiotics improved food intake and reduced the activation of the humoral immune response in healthy weaned pigs but had deferring effects on intestinal microbiota. *Journal of Animal Science*, 89 (12): 4043-53.
7. Serraino A., Bardasi L., Riu R., Pizzamiglio V., Liuzzo G., Galletti G., Giacometti F., Merialdi G. (2012). Visual evaluation of cattle cleanliness and

correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat Science*, 90, 502-506

8. Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B. , Martelli P. (2012). Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *The Veterinary Journal*, 193, 234-239
9. Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Iodice G., Gherpelli Y., Merialdi G., Maioli G., Martelli P. (2012). *Haemophilus parasuis* serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transboundary Emerging Diseases*. 2012 Apr 11. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01326.x. [Epub ahead of print]
- 10. Merialdi G., Galletti E., Guazzetti G., Rosignoli C., Alborali G., Battisti A., Franco A., Bonilauri P., Rugna G., Martelli P. Environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination in pig herds in relation to the productive phase and application of cleaning and disinfection. *Res Vet Sci*, 2012, doi 10.1016/j.rvsc.2012.10.020. [Epub ahead of print]**