UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN
SCIENZE BIOLOGICHE

PREVALENCE,ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM DAIRY INDUSTRIES IN NORTH-CENTRAL AND NORTH-EASTERN GREECE

PREVALENZA, SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI E CARATTERIZZAZIONE DI *STAPHYLOCCOCUS AUREUS* E *STAPHYLOCCOCUS AUREUS* RESISTENTE ALLA METICILLINA ISOLATO DA INDUSTRIE LATTIERO-CASEARIE NELLA GRECIA CENTRO-SETTENTRIONALE E NORD-ORIENTALE

DOCENTE REFERENTE
PROF.SSA FRANCESCA BIAVASCO

LAUREANDA
FEDERICA FORTUNATI

SESSIONE ESTIVA LUGLIO 2020
ANNO ACCADEMICO 2019/2020

STAPHYLOCCOCCUS-AUREUS E *STAPHYLOCCUS-AUREUS* RESITENTE ALLA METICILLINA (MRSA):

S.AUREUS

- Patogeno opportunista e causa varie infezioni alimentari. E' possibile isolarlo dal latte grezzo e dalle attrezzature usate per lavorarlo.
- A temperature permissive possono produrre tossine, stabili nel tratto intestinale. Hanno acquisito il gene *mecA*: responsabile della resistenza alla maggior parte dei β-lattamici.
- Capace di creare biofilm su superfici biotiche e abiotiche, rendendo più difficile la loro eliminazione con disinfettanti e sanificanti

MRSA

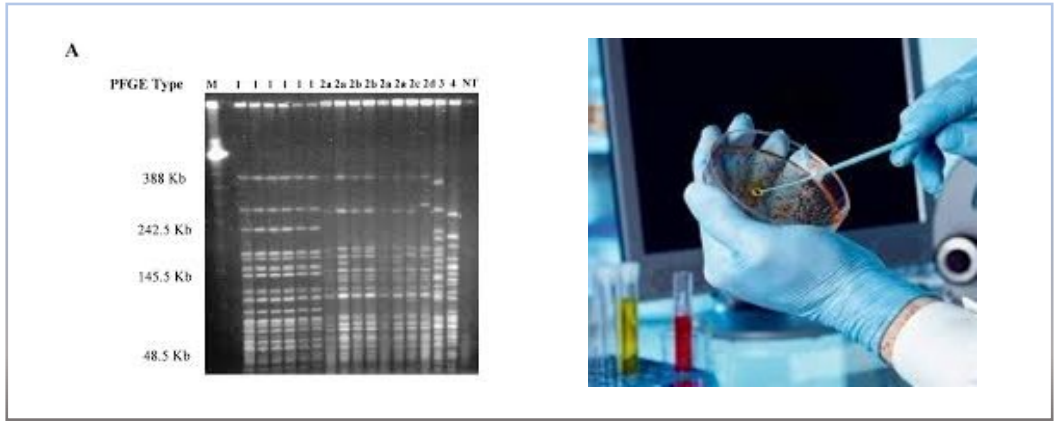
- *S. aureus r*esistente alla meticillina e in genere anche a altre classi di agenti antimicrobici

Il 22% dei campioni sono risultati positivi per *S. aureus*

- Il 99% dei ceppi isolate erano esistenti ad almeno un antibiotico e il 22% sono risultati multiresistenti (MDR).

- MRSA è stato isolato da undici campioni di quattro diverse industrie (A,B,C,D)

MATERIALI E METODI



Raccolta del campione

Isolamento e identificazione

Determinazione della sensibilità agli antibiotici

Rilevazione molecolare e caratterizzazione genetica di MRSA

Tipizzazione con Pulsed Field Gel Elecrophoresis (PFGE)

RACCOLTA DEL CAMPIONE

- 18 campioni di latte grezzo → Prelavati asetticamente 50 ml e posti in tubi sterili.
- 74 campioni di prodotti caseari (Yoghurt, formaggio, burro)
- 56 tamponi dei lavoratori
- 157 tamponi di superfici e attrezzature (infissi e posate) → Posti in 10 ml di Tryptone soy broth con 6,5 % di NaCl e 0,3% di estratto di lievito

Risultati

Table 2
Isolation frequency of *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) from samples of raw-milk tanks, employees, equipment surfaces and dairy products taken from four dairy plants.

Sample type	Plant A			Plant B			Plant C			Plant D			Total		
	No of samples	*S. aureus* (%)	MRSA (%)	No of samples	*S. aureus* (%)	MRSA (%)	No of samples	*S. aureus* (%)	MRSA (%)	No of samples	*S. aureus* (%)	MRSA (%)	No of samples	*S. aureus* (%)	MRSA (%)
Bovine raw milk	1	0	0	1	0	0	7	3	1	0	–	–	9	3 (33.3)	1 (11.1)
Ovine raw milk	2	2	1	1	1	0	3	1	0	1	0	0	7	4 (57.1)	1 (14.3)
Caprine raw milk	1	0	0	0	–	–	0	–	–	1	0	0	2	0	0
Employees	26	10	2	8	5	0	19	9	2	3	1	0	56	25 (44.6)	4 (7.1)
Equipment	43	2	1	31	9	0	52	9	0	31	13	4	157	33 (21.0)	5 (3.2)
Dairy products	32	0	0	10	2	0	26	0	0	6	0	0	74	2 (2.7)	0
Total	105	14 (13.3)	4 (3.8)	51	17 (33.3)	0	107	22 (20.6)	3 (2.8)	42	14 (33.3)	4 (9.5)	305	67 (22.0)	11 (3.6)

Isolamento di S. Aureus e MRSA

- La frequenza di isolamento varia significativamente tra le quattro industrie:
- Per S. Aureus 13,3% industria A, 33,3% industrie B e D, 20,6% industria C.
- Per MRSA la frequenza di isolamento è pari a : 3,8% industria A, 0 industria B, 2,8% industria C, 9,5% industria D.

Risultati

Table 3
Numbers and percentages of *S. aureus* isolates resistant to different antimicrobials according to their isolation source.

Origin of *S. aureus* isolates	No of *S. aureus* isolates	No of *S. aureus* isolates resistant to different antimicrobials[a] (%)													
		P	Ox	Sxt	G	E	Ak	K	T	Tm	Amc	Cp	R	V	C
Bovine raw milk	9	2	1	0	4	0	0	0	4	0	2	0	0	0	0
Ovine raw milk	13	13	2	0	0	0	0	4	0	2	13	0	0	0	0
Equipment	106	106	14	6	32	27	7	11	6	14	97	0	3	8	0
Employees	91	91	16	0	4	16	0	8	8	0	91	0	0	4	8
Dairy products	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	8	0
Total	227	220 (96.9)	33 (14.5)	6 (2.6)	40 (17.6)	43 (18.9)	7 (3.1)	23 (10.1)	18 (7.9)	16 (7.0)	211 (93.0)	0	3 (1.3)	20 (8.8)	8 (3.5)

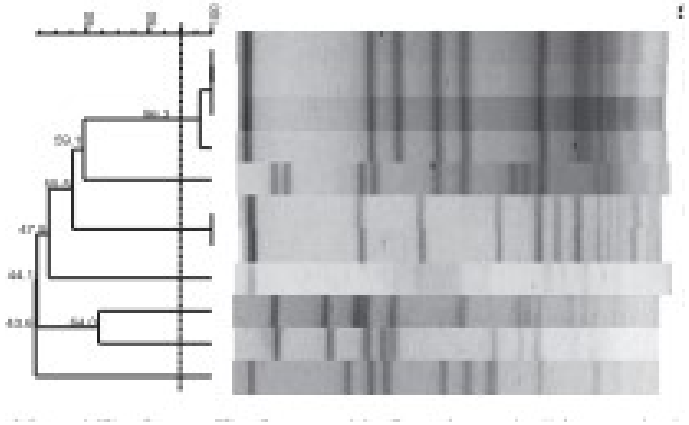
[a] P, penicillin; Ox, oxacillin; Sxt, trimethoprim/sulfamethoxazole; G, gentamicin; E, erythromycin; Ak, amikacin; K, kanamycin; T, tetracycline; Tm, trimethoprim; Amc, amoxicillin/clavulanic acid; Cp, ciprofloxacin; R, rifampicin; V, vancomycin; C, chloramphenicol.

Test di sensibilità agli antibiotici

Dai campioni isolati il 98,7% è risultato ad almeno un antibiotico, il 22,0 % è MDR.

Alte frequenze di resistenza sono state riscontrate per la penicillina 96,9%, amoxicillina e acido clavulanico 93,0% ed eritromicina 18,9%

Risultati



Dendogramma di SmaI Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) pulsotypes (PT) e caratteristiche degli 11 isolati MRSA esaminati nello studio.

Tipizzazione mediante spa e PFGE dopo digestione con *SmaI*

Sette diversi «tipi» spa sono stati identificati tra gli 11 MRSA isolati:

t065(n=4), t021(n=2) e t044, t091, t127, t337 e t3536 (n=1)

Sample id	Plant	Source	sea	sec	see	AMR profile*	OD570**	Spa type	Pulsotype	Cluster
931	D	Door handle-pasteurization	-	+	-	P-Ox-G-E-Amc	++	t065	Smal.01	I
949	D	Door handle-repackaging	-	+	-	P-Ox-G-E-Amc	++	t065	Smal.01	I
956	D	Refrigerator wall	-	+	-	P-Ox-G-E-Amc	++	t065	Smal.01	I
938	D	Cheese mold	-	+	-	P-Ox-G-E-Amc	++	t065	Smal.02	I
897	C	Bowine raw milk	-	+	-	P-Ox-Amc	++	t337	Smal.03	II
413	A	Food handler botting	+	+	-	P-Ox-Amc	++	t021	Smal.04	III
415	A	Door handle-botting	-	+	+	P-Ox-Amc	++	t021	Smal.04	III
805	C	Food handle-thanker diver	-	+	-	P-Ox-Amc	+	t3536	Smal.05	IV
401	A	Food handler-storage	-	+	-	P-Ox-E-K-Amc	++	t127	Smal.06	V
792	C	Food handler-youghurt packaging	-	-	-	P-Ox-Amc-C	++	t091	Smal.07	VI
533	A	Ovine raw milk	-	+	-	P-Ox-K-Amc	++	t044	Smal.08	VII

*P,penicillin;Ox,oxacillin:G,gentamicin;E,eritromicin;K,kanamycin;Amc,amoxicillin/clavulanic acid;C,cloramphenicol
**Moderate biofilm producer(++);weak biofilm producer(+).

Conclusioni

Dall'articolo si evince che:

- ✓presenza di *S. aureus* nel 22,0% e di MRSA nel 3,6% dei campioni analizzati
- ✓Più elevata frequenza del gene per l' enterotossina C negli MRSA che negli MSSA (*S. aureus* meticillino-sensibili)
- ✓Primo isolamento dei tre tipi *spa* t065, t337e t3536 in Grecia
- ✓Isolamento di ceppi MDR e di MRSA enterotossigeni in campioni provenienti da prodotti confezionati o imbottigliati (che non prevedono una ulteriore decontaminazione),
- ✓Inoltre, tutti gli MRSA sono risultati produttori di biofilm, resistenti ai processi standard di sanificazione.

Questi fattori rappresentano un importante rischio per i consumatori, evidenziando la necessità di un monitoraggio continuo e accurato della catena produttiva.

Riassunto

S. Aureus è un importante causa di intossicazione alimentare, mentre S. Aureus resistente alla meticillina (MRSA) rappresenta un serio pericolo per la salute pubblica, in quanto può infettare umani ed animali. Sia S. Aureus che MRSA sono stati isolati dal latte e dai prodotti da esso derivati. L'obbiettivo dello studio è stimare la prevalenza e la sensibilità agli antibiotici di S. Aureus e MRSA in quattro industrie greche e valutare i rischi della diffusione di MRSA nella comunità.

S. Aureus è stato isolato nel 22,0 % dei 305 campioni analizzati mentre MRSA è stato isolato nel 3,6 % .

Tutti gli MRSA isolati sono capaci di formare biofilm, i quali resistono ai vari processi di sanificazione e disinfezione.

Sette diversi «tipi» spa sono stati isolati, tra i quali t065 è il più diffuso; esso insieme a t337 e t3536 sono stati isolati per la prima volta in Grecia.

I risultati dello studio ci mostrano il bisogno di un continuo monitoraggio della catena produttiva e il necessario incremento di processi di sanificazione e pulizia per minimizzare i rischi per la salute pubblica.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Bibliografia

Alexopopulos A., Tzatzimakis, G.,Bezirtzoglou, E.,

Plessas E.,Abas Z.,2011. Microbiological quality and related factors of sheep milk produced in farms of NE Greece . Anaerobe 17 276-279

Clinical and Laboratory standards insitute(CLSI), 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests foor bacteria That GrowAerobically M7-A8. CLSI, Wayne ,PA.