

## **VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI *Streptococcus agalactiae* ISOLATO DAL LATTE DI VACCA DAL 2003 AL 2006 IN RELAZIONE ALLA SENSIBILITÀ DEI CEPPI ISOLATI DALL'UOMO.**

**Varisco G., Bolzoni G., Benicchio S., Bertocchi L.**

### **RIASSUNTO**

Nel presente lavoro vengono valutati i risultati ottenuti nel corso di quattro anni relativamente alla sensibilità agli antibiotici di *Streptococcus agalactiae* rispetto a quanto evidenziato sull'argomento in recenti studi condotti in medicina umana. Pencillina, cefalosporine e amoxicillina si sono confermati farmaci verso i quali non sono insorte resistenze. Differente il comportamento di ampicillina, fluorochinoloni, eritromicina e tetraciclina.

*Parole chiave:* farmacoresistenza, antibiogramma, mastite, terapia

### **SUMMARY**

*Antibiotics susceptibility evaluation of Streptococcus agalactiae isolated from cow's milk from 2003 to 2006 and its relationship with human clinical isolates*

Data about the percentage of susceptibility to antibiotics of *Streptococcus agalactiae* during four years observation are reported. The results are also compared with human data reported internationally. Penicillin, cephalosporine and amoxicillin showed high susceptibility while ampicillin, fluor quinolone, erythromycin and tetracycline have been found to have increased resistance.

*Key words:* antibiotics susceptibility, mastitis, disk diffusion test, therapy

### **INTRODUZIONE**

*Streptococcus agalactiae* o streptococco del gruppo B è un noto germe mastidogeno agente causale della mastite catarrale contagiosa della vacca da latte che può assumere rilevanza anche come agente zoonosico in quanto, seppur patogeno opportunista nell'uomo adulto, può provocare infezioni neonatali con meningite e setticemia nelle puerpere. Può inoltre essere l'agente causale di processi patologici anche in soggetti adulti colpiti da altre patologie primarie come diabete mellito, tumori, o sottoposti a terapie corticosteroidi protrate o sottoposti ad interventi chirurgici come splenectomia.

Nell'uomo adulto e nella donna non gravida è associato a forme osteoarticolari, infezione del tratto urogenitale, infezione della cute, discospondiliti agendo come patogeno opportunista.

*Streptococcus agalactiae* è inoltre segnalato come agente occasionale di sindromi cliniche che vanno da faringiti fino alla morte. Spesso l' infezione viene diagnosticata solo in sede autoptica. In South Carolina si sono verificate nel 2007 due morti acute in soggetti adulti, dovute ad infezione streptococcica del gruppo beta emolitico con forme di polmonite e meningoencefalite, (Batali set al., Am j Forensic Med Pathol, 2007 Mar, 28, 63-8).

Anche se per motivi differenti sia in medicina veterinaria che in medicina umana, è uno dei principali patogeni per i quali sono attivi sistematici programmi di lotta e prevenzione. Uno degli aspetti positivi di questo patogeno è che risulta generalmente sensibile alla Penicillina G ed agli antibiotici beta lattamici in generale. Questi sono infatti, tanto in umana che in veterinaria, gli antibiotici di prima scelta per la profilassi delle infezioni neonatali da una parte e per la terapia e profilassi delle infezioni mammarie dall'altra. Proprio per il fatto che questo germe subisce una forte pressione per l'utilizzo continuo di un unico tipo di antibiotico, rappresenta un modello di riferimento per studiare nel tempo la variazione della sensibilità *in vitro* agli antibiotici. Scopo del presente lavoro è quello di presentare i risultati delle indagini eseguite per la valutazione della sensibilità *in vitro* ai più comuni antibiotici utilizzati in medicina veterinaria e di confrontare i risultati ottenuti con quanto riportato in bibliografia circa la sensibilità agli antibiotici dei ceppi di Streptococco del gruppo B isolati da tamponi vaginali o altre matrici organiche in medicina umana.

#### **MATERIALI E METODI**

Dal 2003 al 2006 presso il laboratorio di batteriologia del reparto produzioni zootecniche di Brescia, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sono stati analizzati 152.586 campioni di latte per la ricerca di *Streptococcus agalactiae* e di questi 25.685 hanno dato esito positivo (16,8%)

La situazione attuale è chiaramente sotto controllo con una percentuale di positività di aziende, inferiore all'uno per cento (0,94% nel 2006) sebbene solo 10 anni fa, dopo oltre 20 anni di controllo sistematico, la percentuale fosse decisamente maggiore (7,4% nel 1996) (tab. 1). Nel controllo routinario effettuato dal laboratorio di batteriologia all'isolamento di *Str. agalactiae* non segue di consueto, come invece per altri germi patogeni, l'esecuzione dell'antibiogramma (metodo per diffusione secondo le procedure definite dai protocolli dell'NCCLS) in quanto la sua nota sensibilità alla penicillina lo rende un germe di facile trattamento antibiotico. Nel periodo 2003-2006 contrariamente a quanto effettuato routinariamente, sono stati sottoposti alla verifica *in vitro* della sensibilità agli antibiotici 176 ceppi di *Str. agalactiae* isolati da campioni di latte di singolo capo (pool di quattro quarti) I ceppi batterici isolati su terreno TKT (Tallium Kristalviolette Tossin) sono stati successivamente trapiantati su terreno Blood agar (agar sangue) per ottenere colonie isolate dalle quali si è proceduto al test di diffusione secondo gli standard internazionali NCCLS.

Per ogni ceppo testato sono state registrate oltre alle classi di appartenenza, Intermedio, Resistente, Sensibile, gli aloni di inibizione espressi in millimetri.

La valutazione degli aloni di inibizione della crescita batterica permette di osservare meglio il fenomeno di sensibilità e resistenza; infatti l'esito di sensibilità di un antibiotico potrebbe ricadere in una classe con aloni molto simili a quelli della classe adiacente (1 o 2 mm) oppure per aloni di dimensioni chiaramente differenti.

Tab. 1 variazione della prevalenza di *Streptococcus agalactiae* negli allevamenti di bovine da latte della provincia di Brescia (1996-2006)

anno	1996	1999	2000	2001	2003	2004	2005	2006
Allevamenti	3483	3033	2822	2800	2403	2377	2266	2345
All.controllati	1422	1670	1275	989	1017	1172	1239	1095
All. infetti	327	296	237	63	35	32	35	22
All. eradicati	222	222	146	15	7	9	9	14
All.non eradicati	105	74	91	48	28	23	26	8
% all. infetti	7,38	4,43	7,14	4,85	2,75	1,96	2,10	0,73
Bovine controll.	13658	14400	9228	6327	5405	5447	2498	1669
Bovine positive				2166	1554	1435	375	180
%bovine posit.				34,2	28,7	26,3	15	10,8

## RISULTATI

I risultati sono riportati in dettaglio in tabella 2 e riguardano una selezione di antibiotici utili per la valutazione della terapia della vacca da latte e per il confronto con i dati di altri autori. La penicillina si è confermata l'antibiotico di scelta nella terapia delle mastiti da *Str. agalactiae* e nel tempo il livello di sensibilità si può considerare stabile. Infatti pur essendo stati registrati ceppi classificati a sensibilità intermedia, valutando gli aloni è possibile osservare la loro estrema vicinanza al limite di sensibilità (28mm). Anche per la cefalotina, utilizzata come indicato dagli standard NCCLS come molecola rappresentativa in vitro delle cefalosporine, e per l'associazione Amoxicillina e acido clavulanico, la loro completa sensibilità, costante negli anni, li pone come antibiotici di riferimento per il trattamento terapeutico. Interessante il comportamento di ampicillina che, pur facendo parte degli antibiotici beta lattamici, sembrerebbe mostrare un progressivo incremento di ceppi classificati nella categoria a sensibilità ridotta (intermedia); inoltre osservando la dimensione degli aloni, in nessuna delle classi predeterminate si avvicinano al limite di quella adiacente a significare la netta appartenenza alla classe assegnata (intermedio, sensibile, resistente). Per quanto riguarda i chinoloni, rappresentati dall'enrofloxacin, escludendo il 2003 per la scarsità di dati, nei tre anni successivi si osservano percentuali variabili di sensibilità; osservando le misure degli aloni si nota come anche i campioni sensibili abbiano valori prossimi a quelli rilevati in ceppi classificati a sensibilità intermedia. Per l'eritromicina, macrolide di elezione in medicina umana per pazienti allergici ai beta lattamici, si è osservato un progressivo incremento dei ceppi resistenti e a sensibilità intermedia, in particolare nel corso del 2006. Gli aloni misurati per questo antibiotico permettono di evidenziare una netta suddivisione nelle tre classi predeterminate. La lincomicina ha dato risultati pressoché costanti negli ultimi tre anni con sensibilità in diminuzione.

Chiaramente evidente e rilevante sembra l'aumento dei ceppi risultati resistenti alla tetraciclina

Tab. 2 Dati di sensibilità di *Str. agalactiae* rilevati dal laboratorio IZSLER

Antibiotico	Dati	2003			2004			2005			2006			
		I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	
Amox. + Ac.Clavu	numero ceppi			45			57			33			37	
	%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	
	Med. alone*			44			36			34			33	
	D.S. alone*			20			12			14			13	
ampicillina	numero ceppi	6	1	41	11	1	45	12		22	18	1	18	
	%	13%	2%	85%	19%	2%	79%	35%	0%	65%	49%	3%	49%	
	Med. alone*	25	20	49	27	22	45	28		38	25	18	37	
	D.S. alone*	3	n.d.	20	1	n.d.	18	2		16	2	n.d.	15	
cefalotina	numero ceppi			40			57			34			37	
	%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	
	Med. alone*			48			41			35			32	
	D.S. alone*			21			17			13			12	
enrofloxacin	numero ceppi	8	5	1	12	1	16	15		14	27	5	5	
	%	57%	36%	7%	41%	3%	55%	52%	0%	48%	73%	14%	14%	
	Med. alone*	19	16	23	20	17	23	20		23	20	16	24	
	D.S. alone*	1	1	n.d.	1	n.d.	2	1		2	1	2	3	
eritromicina	numero ceppi	4	6	37	2	8	47	1	5	28	3	7	27	
	%	9%	13%	79%	4%	14%	82%	3%	15%	82%	8%	19%	73%	
	Med. alone*	19	6	28	19	3	27	20	7	29	18	4	25	
	D.S. alone*	2	7	8	1	5	3	n.d.	6	12	2	5	3	
lincomicina	numero ceppi	24	8	15	19	10	28	14	6	13	14	5	18	
	%	51%	17%	32%	33%	18%	49%	42%	18%	39%	38%	14%	49%	
	Med. alone*	18	4	24	19	1	23	19	2	25	19	n.r.	23	
	D.S. alone*	2	6	3	1	4	1	2	5	2	2	n.r.	2	
penicillina	numero ceppi	6		44	6		51	6		28	7		30	
	%	12%		88%	11%	0%	89%	18%	0%	82%	19%	0%	81%	
	Med. alone*	24		39	26		37	26		36	25		31	
	D.S. alone*	3		17	1		14	2		15	2		8	
tetraciclina	numero ceppi		14	34	1	23	33	1	12	21		20	17	
	%		0%	29%	71%	2%	40%	58%	3%	35%	62%	0%	54%	46%
	Med. alone*		8	25	16	5	26	10	8	25		5	23	
	D.S. alone*		5	3	n.d.	5	3	n.d.	5	3		6	3	

\* diametro dell'alone misurato in mm n.d. non determinabile n.r. non rilevato

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante la penicillina venga utilizzata come antibiotico di prima scelta in tutto il mondo sia per gli animali che per l'uomo la percentuale di sensibilità resta elevata se non addirittura totale (tab.3). Nei rari casi di sensibilità intermedia correlata ad un aumento della MIC (minima concentrazione inibente) un aumento della dose

terapeutica risulterebbe comunque efficace. Pur non essendo l'eritromicina utilizzata nella comune pratica buiatrica, e soprattutto per il trattamento terapeutico delle mastiti, i dati registrati indicherebbero percentuali di resistenza analoghe a quanto registrato in medicina umana dove al contrario è il farmaco di scelta nella profilassi pre ed intrapartum nei soggetti allergici alla penicillina. Molto più elevate le resistenze alla clindamicina se confrontata con i dati riferibili alla lincomicina, antibiotico del gruppo delle lincosamidi utilizzato in umana. I dati rilevati per le cefalosporine sono in linea con quanto riportato dalla letteratura internazionale ma differiscono da quanto rilevato da F.Pirali (Boll. Micr.8,3 5-9, 2002) che ha segnalato un aumento delle resistenze al ceftriaxone negli anni 99-2002. Concordi con lo stesso autore i risultati di Messico e Thailandia per l'ampicillina, a differenza di quanto emergerebbe dai nostri dati, dai quali si evidenzia una tendenza all'aumento della classe a moderata sensibilità. In ultimo da rilevare l'incremento delle resistenze alla tetraciclina, anche se molto inferiori rispetto a quanto riportato in medicina umana; la rilevazione di questa tendenza risulta interessante in relazione allo scarso utilizzo di questo antibiotico sia in medicina veterinaria che in medicina umana per la terapia delle mastiti o la profilassi pre ed intra partum di *Str. agalactiae*.

I dati ottenuti dalla valutazione delle sensibilità agli antibiotici nel corso del tempo confermano la complessità dell'argomento, la mancanza di una correlazione diretta tra utilizzo di un farmaco e insorgenza di farmaco resistenza. La pressione chemioterapia va infatti affrontata nell'insieme dell'utilizzo dei farmaci ma l'osservazione puntuale anche per un solo germe può dare spunti di riflessione importanti. La conferma viene ad esempio dai dati relativi all'eritromicina, scarsamente utilizzata in medicina veterinaria, che indicano una tendenza alla resistenza anche in ceppi di *Str. agalactiae* bovini, non sottoposti a pressione farmacologia da utilizzo in terapia o profilassi. Analogamente farmaci beta lattamici e penicillina in particolare pur essendo ampiamente utilizzati non sembrano provocare insorgenza di resistenze. Interessante inoltre notare come, seppur con alcune differenze, i dati riportati a livello internazionale tendano a sovrapporsi.

Tab.3 dati di sensibilità di *Str. agalactiae* riportati in letteratura

Nazione anno	Italia 99/02	Tunisia 03/04	Tunisia 2006	Giappone 86/86e 99/2000	Turchia 2006	Thailandia 2004/05	Messico 2002
eritromicina	81%	64%	48,70%	97%	75,50%	98,50%	64,10%
penicillinaG	92,30%	100%		100%	100%	100%	100%
amoxicillina		100%	100%				100%
vancomicina		100%			100%	100%	
pristinamicina		100%	100%				
cafalosporina	83,50%			100%			100%
carbapenem				100%			
clindamicina	86,70%			99%	80,60%	97%	
tetraciclina			2,60%		18,40%		
ampicillina	91,70%					100%	100%

## BIBLIOGRAFIA

1. Arisoy AS., Altinisk B., Tunger O., Kurutepe S., Ispahi C. (2003) "Maternal carriage and antimicrobial resistance profile of group B Streptococcus" *Infection*, 31 (4), 244-6.
2. Batalis NI., Caplan MJ., Schandl CA. (2007) "Acute deaths in non pregnant adults due to invasive streptococcal infections" *Am J Forensic Med Pathol*, 28 (1), 63-8.
3. Daley AJ., Isaacs D., Australasian Study Group for Neonatal Infections (2004) "Ten year study on the effect of intrapartum antibiotic prophylaxis on early onset group B streptococcal and Escherichia coli neonatal sepsis in Australasia" *Pediatric Infect Dis J.*, 23 (7), 630-4.
4. Diaz-Gonzalvez E., Zarza B., Abreu P. Cobo J., Orte J., Dronza F. (2005) "Spondylodiscitis and sacroilitis due to Streptococcus agalactiae in adults: clinical case and literature review" *Enferm Infecc Microbiol. Clin.*, 23 (2), 71-5.
5. Ferjani A., Ben Abdallah H., Ben Saida N., Gozzi C., Boukadida J. (2006) "Vaginal colonization of the Streptococcus agalactiae in pregnant woman in Tunisia: risk factors and susceptibility of isolates to antibiotics" *Bull Soc Pathol Exot.*, 99 (2), 99-102.
6. Gimenez M., Sopena N., Vinado B., Cardona PJ., Pedro-Botet ML., Coroleu W., Arnal J. (1996) "Invasive Streptococcus agalactiae infections at a general university hospital over a 10 year period" *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 14 (5), 300-3.
7. Gonzalez Pedraza Aviles A., Ortiz Zaragoza MC., Mota Vazquez R. (2002) "Serotypes and antimicrobial susceptibility of group B Streptococcus from pregnant women in Mexico" *Rev Latinoam Microbiol.*, 44 (3-4), 133-6.
8. Yenisehirli G., Bulut Y., Demitürk f., Caliskan AC. (2006) "Antimicrobial susceptibilities and serotype distribution of Streptococcus agalactiae strains isolated from pregnant women" *Mikrobiyol Bul.*, 40 (3), 155-60.
9. Matsubara K., Nishiyama Y., Katayama K., Yamamoto G., Sugiyama M., Murai T., Baba K. (2001) "Change of antimicrobial susceptibility of group B streptococci over 15 years in Japan" *J Antimicrob Chemother*, 48 (4), 579-82.
10. Pirali F. (2002) "Andamento delle resistenze agli antibiotici di Streptococco di gruppo B (*Streptococcus agalactia*) nel quadriennio 1999-2002" *Boll. Micr. Ind. Lab.* 8 (3) 5-
11. Tor-Udom S., Tor-Udom P., Hiriote W. (2006) "The prevalence of streptococcus agalactiae (groupB) colonization in pregnant women at Thammasat Hospital" *J Med Assoc Thai*, 89 (4), 411-4.
12. Toumi A., Ferjani A., Ben Abdallah H., Boukadida J. (2006) "Streptococcus agalactiae in non pregnant adults" *Tunis Med.*, 84 (3), 161-4.