



Streptococcus suis, un vecchio problema in un contesto mutato: evoluzione dell'approccio diagnostico.

Chiara F. Magistrali

Area Ricerca e Sviluppo, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Di cosa parleremo

- *Streptococcus suis* come agente patogeno
- Epidemiologia dell'infezione: cosa sappiamo
- Come è cambiato il contesto
- Un approccio diagnostico diverso?
- Come interpretare i risultati
- Altri sistemi di controllo sono possibili?



Streptococcus suis come agente patogeno

Si tratta di un normale abitante delle vie aeree superiori

Alcuni sierotipi sono patogeni, altri no

La distribuzione dei diversi sierotipi nelle forme di streptococcosi suina non è omogenea a livello mondiale

In particolare, la distribuzione del sierotipo 2 non è omogenea

Country	Serotype 2 from clinical cases
France	70%
Spain*	41%
Italy	62% (21% sero 9)
Netherlands/Belgium*	40%
UK	45%
Germany*	40%
Canada/USA	<20%

Courtesy of Prof. M. Gottschalk

Streptococcus suis come agente patogeno

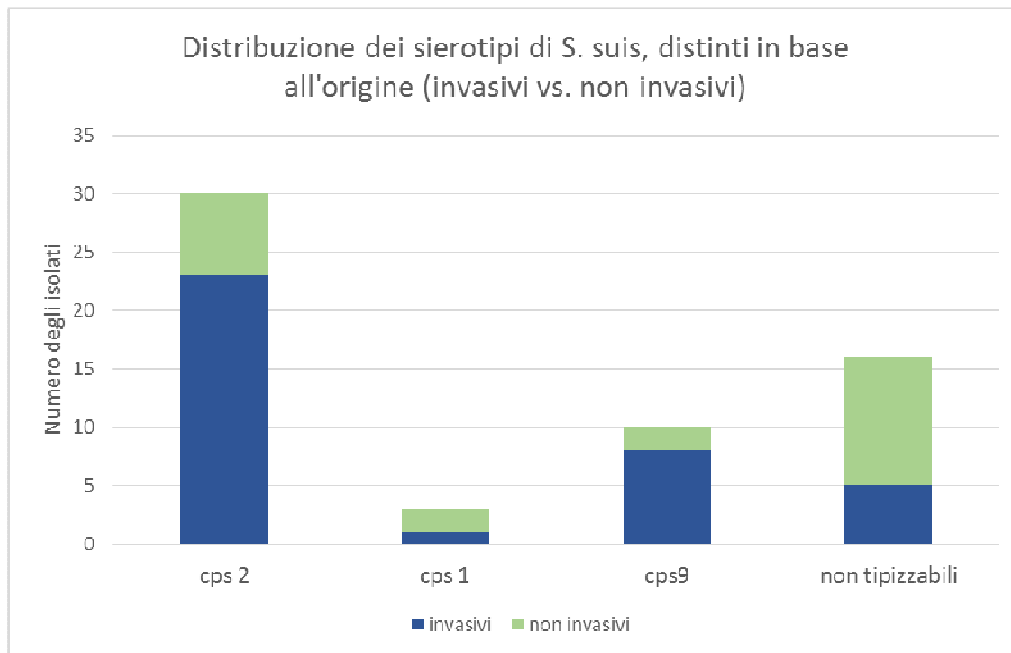


TABLE 4

Virulence-associated gene profiles in *Streptococcus suis* isolates, Italy, 2003-2007 (n=59)

Profile	Invasive	Non-invasive
<i>cps2</i> isolates (n = 30)	23	7
<i>mrp epf^{class 1} ofs^{type 1} sly arcA</i>	19	4
<i>mrp epf ofs^{type 1} sly arcA</i>	2*	1
<i>mrp epf ofs^{type 15} sly arcA</i>	1	-
<i>mrp ofs^{type 1} sly arcA</i>	1	1
<i>mrp ofs^{type 3a} arcA</i>	-	1
<i>cps1</i> isolates (n = 3)	1	2
<i>mrp⁵ epf^{class 1} ofs^{type 1} sly arcA</i>	1	1
<i>arcA</i>	-	1
<i>cps9</i> isolates (n = 10)	8	2
<i>mrp* ofs^{type 2} sly arcA</i>	3	-
<i>mrp ofs^{type 3b} sly arcA</i>	1	1
<i>mrp sly arcA</i>	1	1
<i>mrp* sly arcA</i>	2	-
<i>sly arcA</i>	1	-
*NT isolates (n = 16)	5	11
<i>mrp epf⁹¹⁵ ofs^{type 2} sly arcA</i>	1	-
<i>mrp ofs^{type 3b} sly arcA</i>	-	2
<i>epf⁹¹⁵ sly arcA</i>	-	1
<i>mrp sly arcA</i>	1	-
<i>mrp* arcA</i>	-	2
<i>sly arcA</i>	3	2
<i>arcA</i>	-	4

* NT: non-typeable (neither *cps1*, nor 2, 7 or 9).

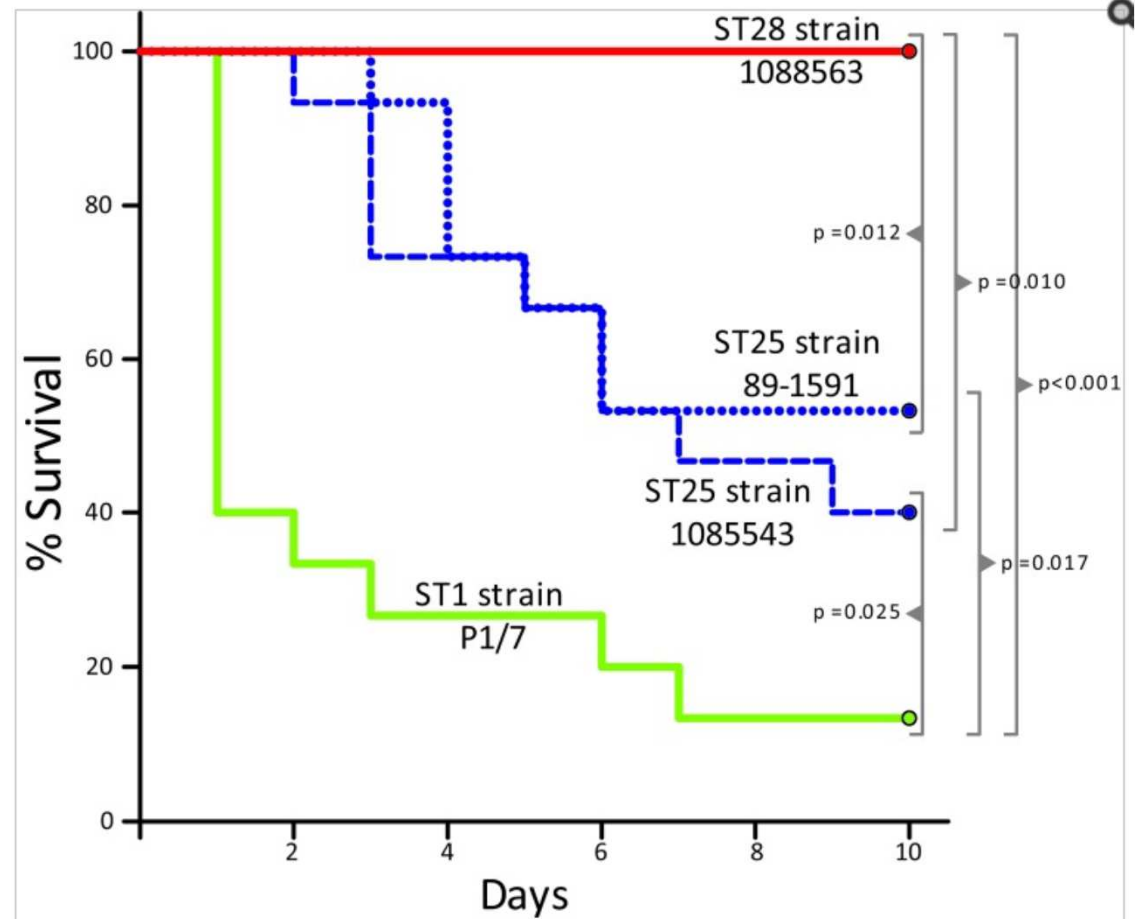
* Human isolates

Principalli, Eurosurveillance, 2011

Streptococcus suis come agente patogeno

Anche all'interno del sierotipo 2 non tutti i ceppi hanno la stessa patogenicità

La tipizzazione molecolare permette la distinzione di sequence type più o meno patogeni



Fittipaldi, Emerg Infect Dis 2011

Streptococcus suis come agente patogeno

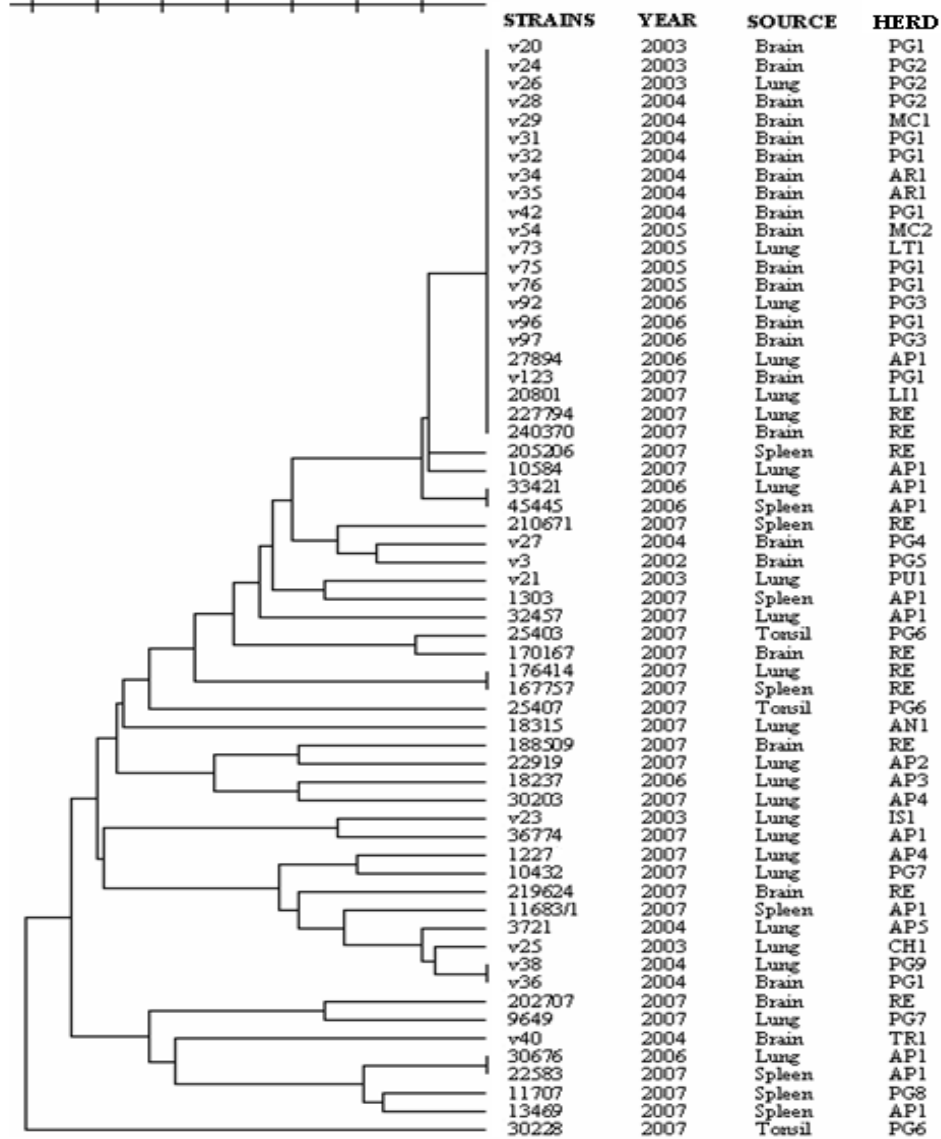
Association of *Streptococcus suis* serotype 2 STs and commonly used virulence markers in isolates from North America†

ST	No. strains	Presence of factor-encoding gene								Phenotype		
		<i>mrp</i> variant‡								Hemolysis§	MRP¶	EF
		<i>sly</i>	<i>mrp</i>	<i>mrp</i> ⁵	<i>mrp</i> [*]	<i>mrp</i> ^{**}	<i>mrp</i> ^{***}	ND	<i>epf</i>			
1	11	11	9	0	0	0	0	2	11	11	9	11
25	36	0	0	1	1	8	23	3	0	0	0	0
28	49	0	42	6	1	0	0	0	3	0	49	0

I Sequence type patogeni sono associati a fattori di virulenza riconosciuti

Fittipaldi, Emerg Infect Dis 2011

30 40 50 60 70 80 90

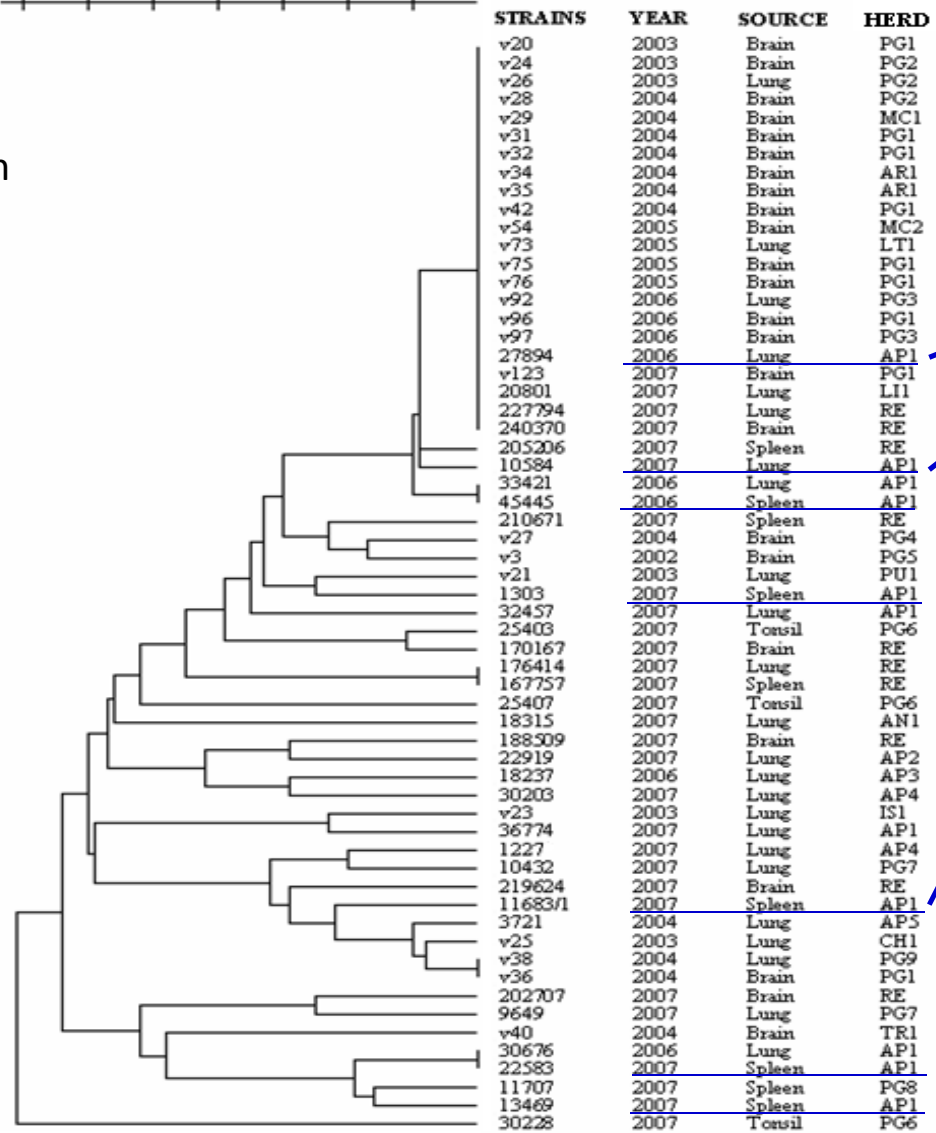
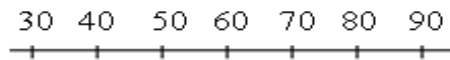


Presenza di un clone dominante

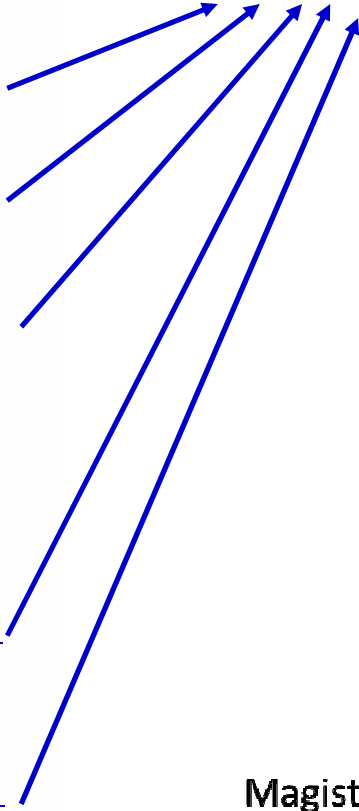
epf- / mrp+ / cps2+ / sly+

Magistrali, 2009

Presenza di ceppi diversi in un solo allevamento e in un solo focolaio



Allevamento AP1



Magistrali, 2009



Streptococcus suis come agente patogeno

Si tratta di un patogeno primario o di un agente di irruzione secondaria?

Serie di fattori predisponenti riconosciuti:

Sovraffollamento

Ventilazione inadeguata, elevata umidità, biosicurezza

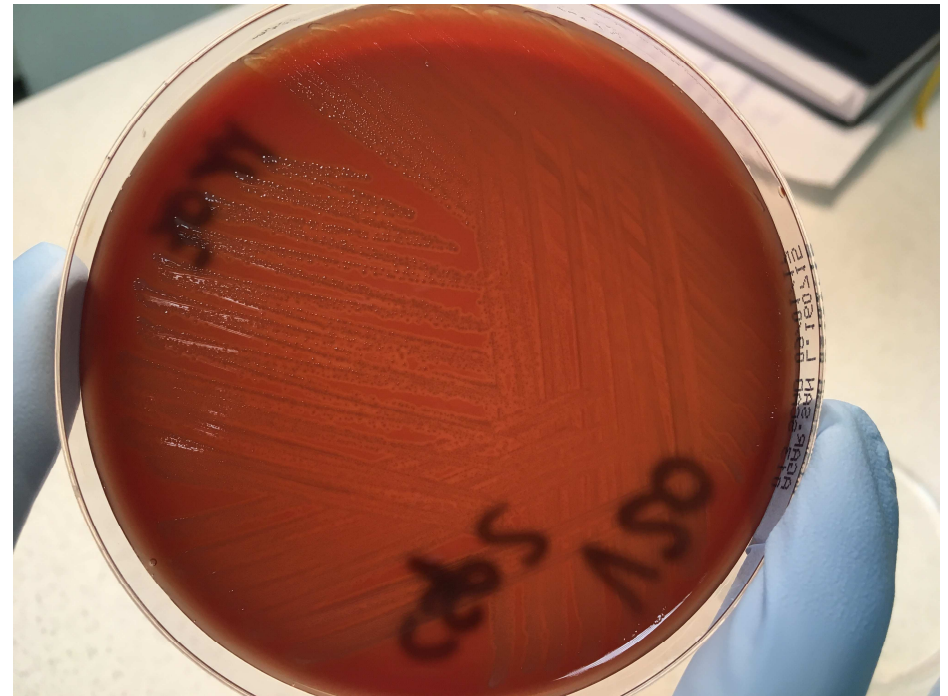
Rimescolamenti di animali

Variazioni di temperatura nel corso della giornata

Polverosità ambientale e livelli di ammoniaca

Procedure traumatiche (artrite)

Infezioni concomitanti



Zavattini, 2015

Streptococcus suis è un agente di polmonite nel suino?

Non è un agente patogeno primario
Viene isolato nel 20% di polmoni sani: non utilizzare il polmone come organo per l'isolamento in caso di setticemia!
Può essere associato ad altre infezioni: PRRSV e SIV

Vet Pathol 37:143–152 (2000)

Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-induced Increase in Susceptibility to *Streptococcus suis* Infection

R. THANAWONGNUWECH, G. B. BROWN, P. G. HALBUR, J. A. ROTH, R. L. ROYER, AND B. J. THACKER

Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (RT); and Departments of Veterinary Microbiology and Preventive Medicine (GBB, JAR) and Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine (PGH, RLR, BJT), College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA

Abstract. Eighty 3-week-old crossbred pigs were randomly assigned to six groups (13–14 pigs/group). Group 1 pigs served as uninoculated controls, group 2 pigs were inoculated intranasally (IN) with *Streptococcus suis* serotype 2, group 3 pigs were inoculated IN with a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine, group 4 pigs were inoculated IN with the same vaccine and with *S. suis*, group 5 pigs were inoculated IN with VR-2385 (a high-virulence strain of PRRSV), and group 6 pigs were inoculated IN with VR-2385 and *S. suis*. Pigs exposed to both PRRSV and *S. suis* were inoculated with PRRSV 7 days prior to *S. suis* inoculation. The pigs were 26 days old when inoculated with *S. suis*. Respiratory disease was significantly more severe in groups 5 and 6. Mortality rates were the highest in group 6 (97.5%). This was



Dynamic Virus-Bacterium Interactions in a Porcine Precision-Cut Lung Slice Coinfection Model: Swine Influenza Virus Paves the Way for *Streptococcus suis* Infection in a Two-Step Process

F. Meng,^a N. H. Wu,^a A. Nerlich,^{b*} G. Herrler,^a P. Valentin-Weigand,^b M. Seitz^b

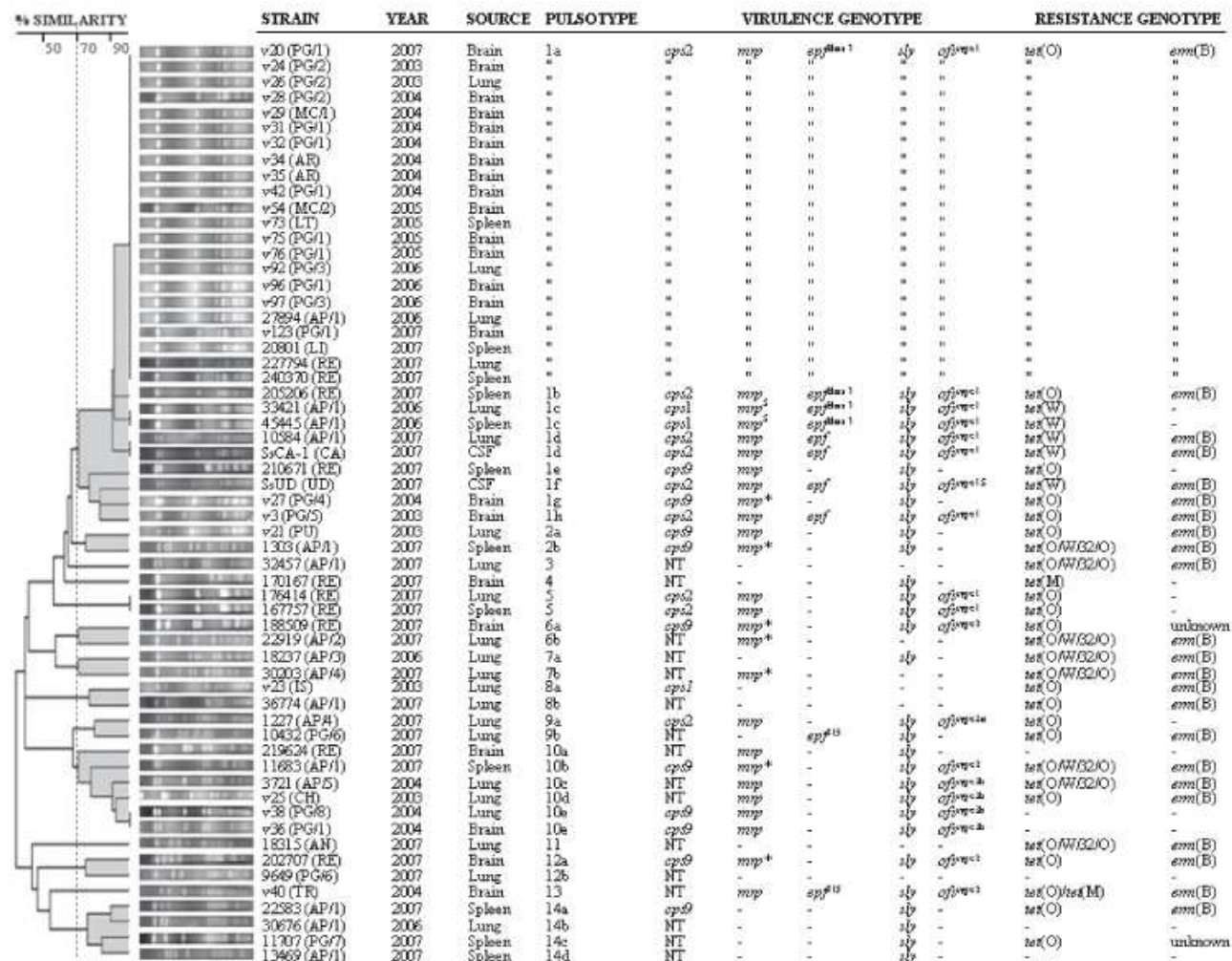
Institute for Virology, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany^a; Institute for Microbiology, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany^b

Swine influenza virus (SIV) and *Streptococcus suis* are common pathogens of the respiratory tract in pigs, with both being associated with pneumonia. The interactions of both pathogens and their contribution to copathogenesis are only poorly understood. In the present study, we established a porcine precision-cut lung slice (PCLS) coinfection model and analyzed the effects of a primary SIV infection on secondary infection by *S. suis* at different time points. We found that SIV promoted adherence, colonization, and invasion of *S. suis* in a two-step process. First, in the initial stages, these effects were dependent on bacterial encapsulation, as shown by selective adherence of encapsulated, but not unencapsulated, *S. suis* to SIV-infected cells. Second, at a later stage of infection, SIV promoted *S. suis* adherence and invasion of deeper tissues by damaging ciliated epithelial cells. This effect was seen with a highly virulent SIV subtype H3N2 strain but not with a low-virulence subtype H1N1 strain, and it was independent of the bacterial capsule, since an unencapsulated *S. suis* mutant behaved in a way similar to that of the encapsulated wild-type strain. In conclusion, the PCLS coinfection model established here revealed novel insights into the dynamic interactions between SIV and *S. suis* during infection of the respiratory tract. It showed that at least two different mechanisms contribute to the beneficial effects of SIV for *S. suis*, including capsule-mediated bacterial attachment to SIV-infected cells and capsule-independent effects involving virus-mediated damage of ciliated epithelial cells.



FIGURE

Similarity index of the 59 *Streptococcus suis* isolates, Italy, 2003-2007



Principalli,
Eurosurveillance, 2011

For each isolate, the year and the source of isolation and the virulence and resistance genotypes are shown. Pulsed-field gel electrophoresis pulsotypes sharing >70% similarity were grouped into clusters (gray).
Unknown: neither *erm*(A) nor *erm*(B) nor *mef*(A).
SsCA-1 and SsUD are the two human isolates



Il contesto è cambiato

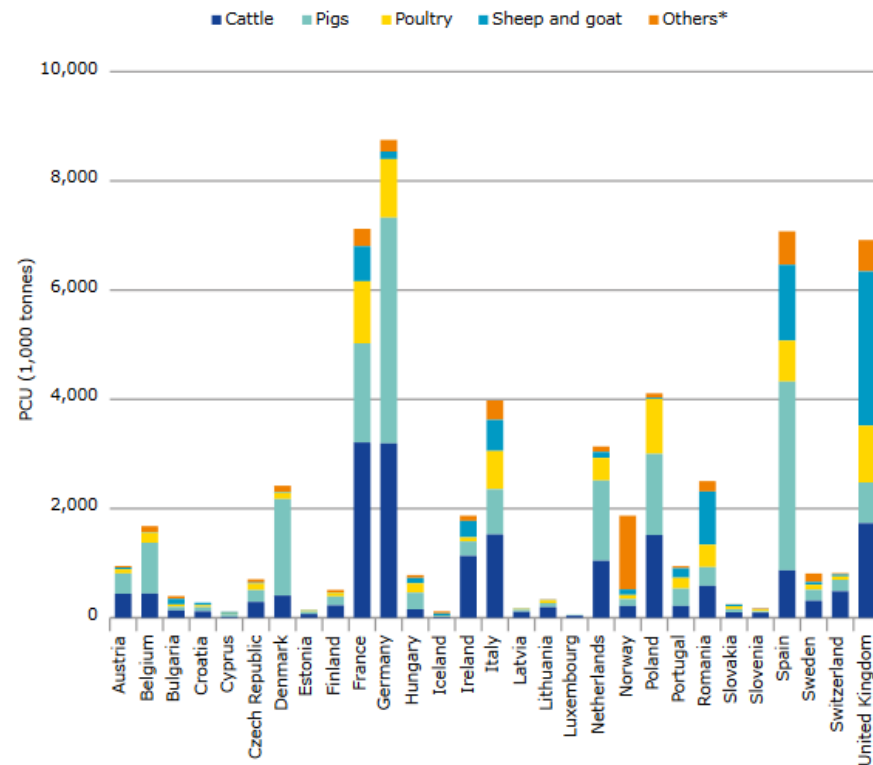
Forte preoccupazione per l'aumento dell'antibioticoresistenza

Pressione sul settore zootecnico per la riduzione dell'impiego degli antibiotici

Necessità di giustificare l'impiego di antimicrobici

Monitoraggio dell'impiego di antibiotici in zootecnia

Figure 2. The denominator (PCU) and its distribution by the food-producing animal species, including horses, (PCU = 1 kg), by country, in 2014



* Includes horses and, for some countries, fish and/or rabbits.

ESVAC, 2015

Il contesto è cambiato

Figure 26. Spatial distribution of sales of penicillins for food-producing animals, in mg/PCU, by country, for 2014

Forte preoccupazione per l'aumento dell'antibioticoresistenza

Pressione sul settore zootecnico per la riduzione dell'impiego degli antibiotici

Necessità di giustificare l'impiego di antimicrobici

Monitoraggio dell'impiego di antibiotici in zootecnia



ESVAC, 2015

Il contesto è cambiato

Forte preoccupazione per l'aumento dell'antibiotico-resistenza

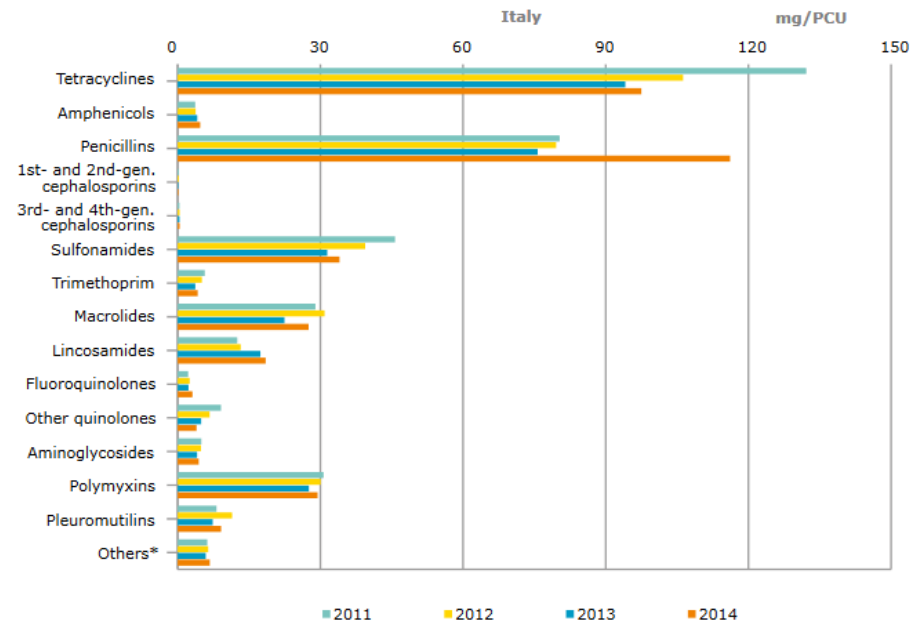
Pressione sul settore zootecnico per la riduzione dell'impiego degli antibiotici

Necessità di giustificare l'impiego di antimicrobici

Monitoraggio dell'impiego di antibiotici in zootecnia

Italy

Figure 92. Sales (mg/PCU) by antimicrobial class in Italy, from 2011 to 2014



ESVAC, 2015

Il contesto è cambiato

Progetto pilota della Regione Umbria in collaborazione con IZSUM- Centro di Farmacovigilanza regione Umbria

Calcolo DDD

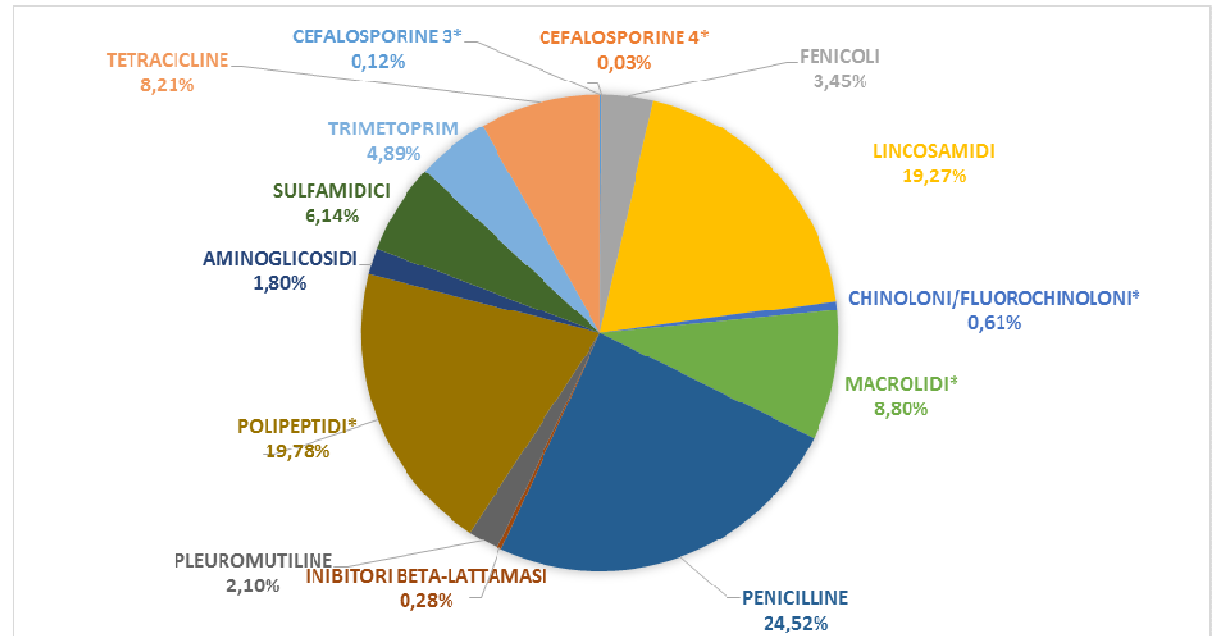


Figura 1: % DDD/1000 animali-die per classe di farmaco nella specie suina- anno 2014

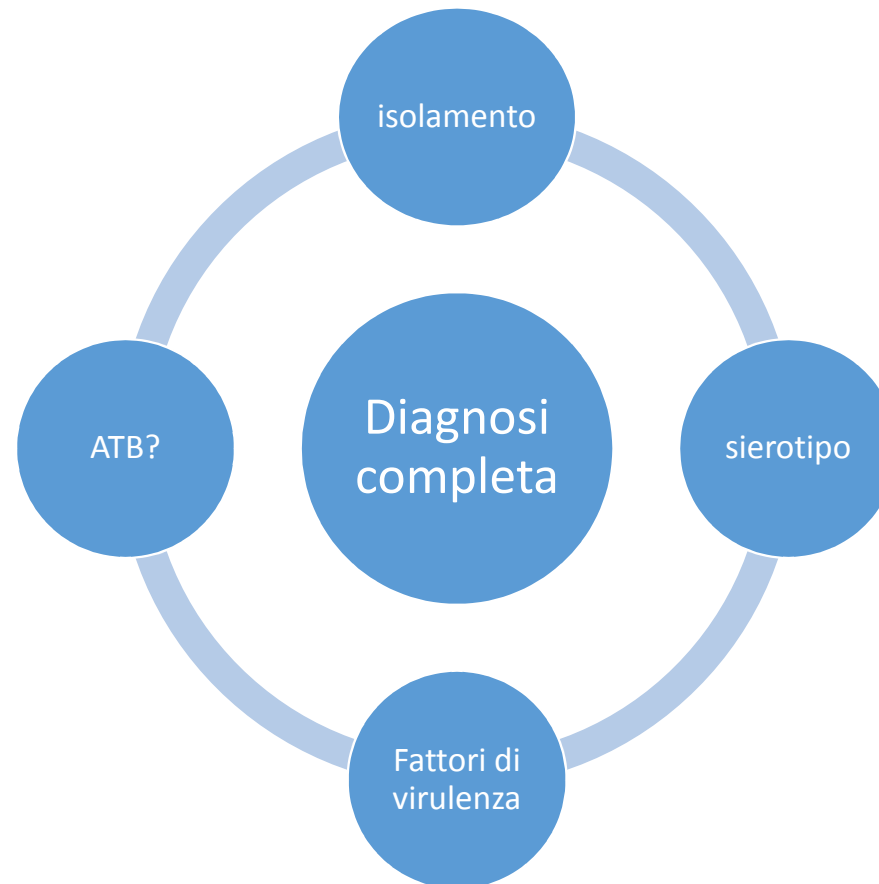
Streptococcus suis: quali elementi per indirizzare la diagnosi

Prelievo:

Esame necroscopico di 2-3 animali, da 2 gg diversi

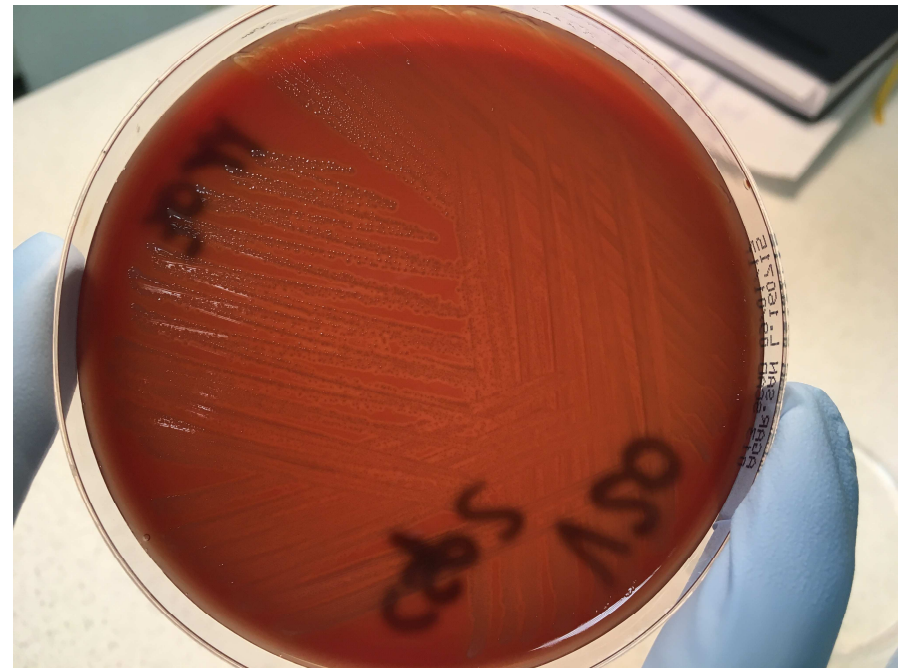
Non sottoposti a trattamento

No tamponi tonsillari e campioni delle vie aeree in generale



Streptococcus suis: quali elementi per leggere il referto diagnostico

Streptococcus suis presente in sedi indicative
In un focolaio, un solo sierotipo o più sierotipi?
Se sierotipo 2: sono presenti anche i geni codificanti per le tossine?
Antibiogramma e/o MIC

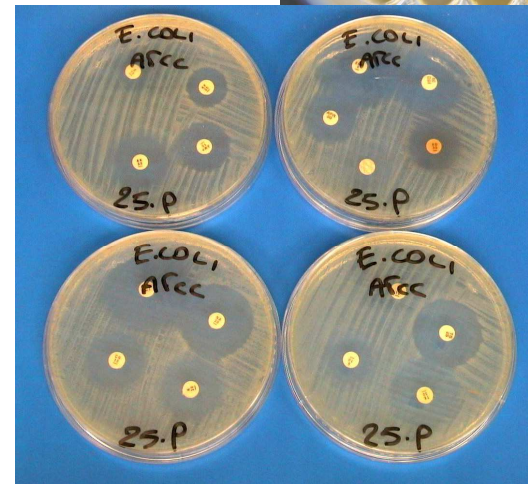


Streptococcus suis: quali elementi per leggere il referto di sensibilità agli antimicrobici

Che tipo di accertamento: MIC vs. Kirby-Bauer o antibiogramma

Che tipo di molecole possiamo inserire e come leggerle: le molecole equivalenti

Es. ampicillina-amoxicillina- amoxicillina+acido clavulanico



Streptococcus suis: quali elementi per leggere il referto di sensibilità agli antimicrobici

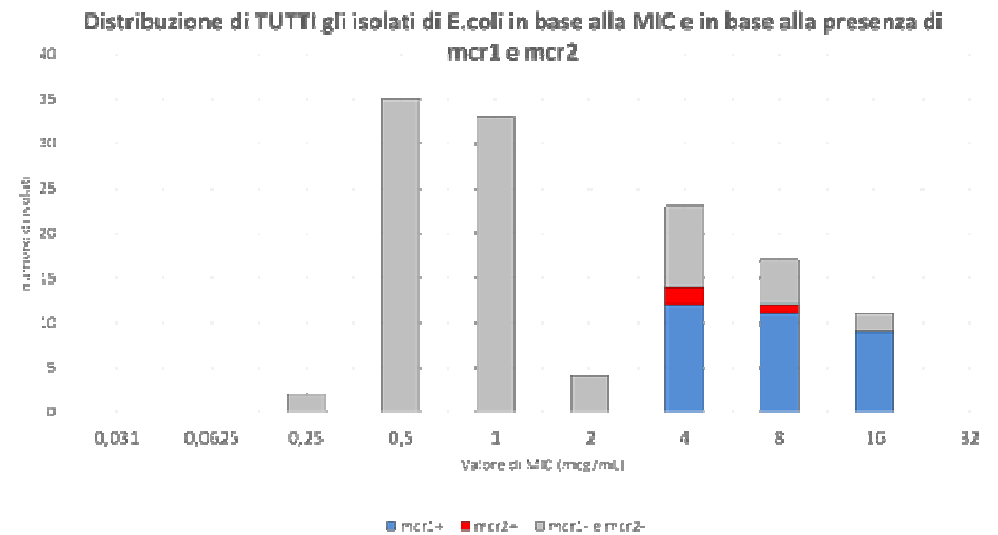
I dati di sensibilità agli antimicrobici è fortemente limitata dall'assenza di breakpoint clinici relativi alla specie e al sito di isolamento

50

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2D. *Streptococcus* spp. (Continued)

Test/Report Group	Body Site	Antimicrobial Agent	Organism	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (μg/mL)			Comments
					S	I	R	S	I	R	
Fluoroquinolones (Continued)											
Cats											
A	Skin, soft tissue	Enrofloxacin	<i>Streptococcus</i> spp.	5 μg	≥23	17–22	≤16	≤0.5	1–2	≥4	
A	Skin, soft tissue	Marfloxacina	<i>Streptococcus</i> spp.	5 μg	≥20	15–19	≤14	≤1	2	≥4	
A	Skin, soft tissue	Orbifloxacin	<i>Streptococcus</i> spp.	10 μg	≥23	18–22	≤17	≤1	2–4	≥8	
A	Skin, respiratory	Pradofloxacin	<i>S. suis</i>	5 μg	≥24	–	–	≤0.25	–	–	See comment (21).
Swine											
A	Respiratory	Enrofloxacin	<i>S. suis</i>	–	–	–	–	≤0.5	1	≥2	(22) Disk diffusion interpretive criteria have not been established. It is recommended that <i>S. suis</i> isolates be tested by MIC determination.
Tetracyclines											
Dogs											
A	Skin, soft tissue	Clindamycin	Streptococci: β-hemolytic group	2 μg	≥21	15–20	≤14	≤0.5	1–2	≥4	(23) Clindamycin is also used to test for susceptibility to lincomycin. Clindamycin is more active than lincomycin against most staphylococcal strains.
Cattle											
A	Mastitis	Pirlimycin	<i>S. agalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i> <i>S. uberis</i>	2 μg	≥13	–	≤12	≤2	–	≥4	
Humans											
		Clindamycin	Streptococci: β-hemolytic group Viridans group <i>S. pneumoniae</i>	2 μg	≥19	16–18	≤15	≤0.25	0.5	≥1	(24) Inducible clindamycin resistance can be detected by disk diffusion using the D-zone test and broth microdilution. See Table 9G.
Folate Pathway Inhibitors											
Humans											
		Trimethoprim-sulfamethoxazole	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.25/23.75 μg	≥19	16–18	≤15	≤0.5/9.5	1/19–2/38	≥4/76	



Streptococcus suis: esiste un problema di resistenza di S. suis in Italia?

Dati relativi alla sensibilità agli antimicrobici: isolati collezionati nel periodo 2003-2007, n=63 (Barocci et al., 2008)

	<0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
Penicillina	88%	1.5%	4.8%	1.5%	-	-	-	3.2%				
Ampicillina			95.2%	1.5%		3.2%						
Enrofloxacin	1.5%		15.9%	61.9%	15.9%	4.8%						
Florfenicolo					47.6%	52.4%						
Clindamicina			12.7%		1.5%				84.1%			
Tetraciclina				7.9%			7.9%	84.1%				
Tilosina				15.9%						84.1%		
Tilmicosina							15.9%					84.1%

Streptococcus suis: esiste un problema di resistenza di *S. suis* in Italia?

Table 4: Antibiotic resistance phenotype of *Streptococcus suis* cps2+ isolates*

Antibiotic	S strains (%)	R strains (%)
Amoxicillin	35 (97.2)	1 (2.8)
Amoxicillin-clavulanic acid	35 (97.2)	1 (2.8)
Ampicillin	36 (100.0)	0 (0.0)
Ceftiofur	34 (94.4)	2 (5.6)
Enrofloxacin	32 (88.9)	4 (11.1)
Erythromycin	22 (61.1)	14 (38.9)
Penicillin G	35 (97.2)	1 (2.8)
Tetracycline	4 (11.1)	32 (88.9)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	30 (83.3)	6 (16.7)

* Study described in Table 1. *Streptococcus suis* isolates (n = 36) were tested for susceptibility to antimicrobial agents. No isolates demonstrated intermediate resistance. S = susceptible; R = resistant.

Streptococcus suis: esiste un problema di resistenza di *S. suis*?

Table 1

MIC distribution (%) for *Streptococcus suis* isolates from April 2013 till June 2015.

<i>Streptococcus suis</i> (n=1163) ^a																	
MIC values (µg/mL)																	
Antimicrobial agent	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
Amoxicillin/clavulanic acid ^b				99.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0						
Ampicillin		97.9	0.9	0.5	0.2	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0						
Cefepime					98.5	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.1						
Ceftiofur				95.6	2.1	0.3	1.2	0.3	0.3	0.2							
Clindamycin				50.7	1.2	0.8	0.6	1.3	45.4								
Enrofloxacin				73.6	25.0	0.8	0.0	0.3	0.3								
Erythromycin			51.1	0.7	0.3	0.3	0.9	0.9	2.8	43.0							
Florfenicol							99.5	0.4	0.1	0.0							
Neomycin								9.5	38.5	38.3	13.7						
Oxacillin				97.6	1.9	0.2	0.1	0.1	0.1								
Penicillin		95.2	1.9	1.7	0.7	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0						
Sulfamethoxazole										16.7	0.9	1.6	0.8	0.4	1.4	78.2	
Trimethoprim/sulfamethoxazole ^c	21.5	22.5	27.2	16.2	4.6	3.4	1.6	0.9	2.1								
Tetracycline				3.1	10.2	8.3	2.7	1.5	6.8	18.9	48.5						

Van Hout et al., Vet Microbiol, 2016

Streptococcus suis: dati epidemiologici

Trasmissione della malattia: cosa sappiamo

Presenza di carrier

Ruolo delle scrofe

Trasmissione verticale e orizzontale

Trasmissione indiretta:

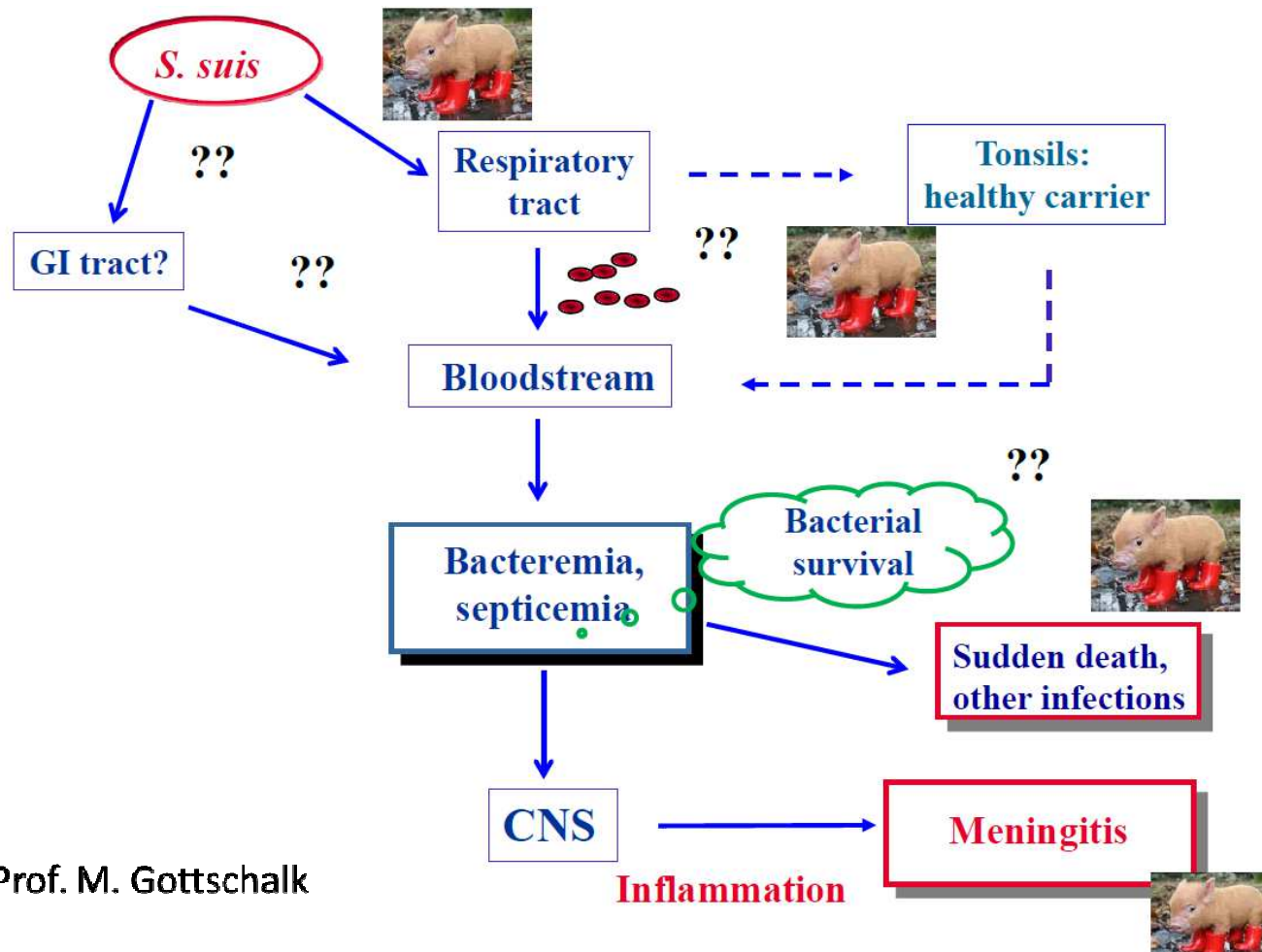
Altri animali, persone,

Via aerogena a lunga distanza

Insetti: mosche



Streptococcus suis: patogenesi



Courtesy of Prof. M. Gottschalk

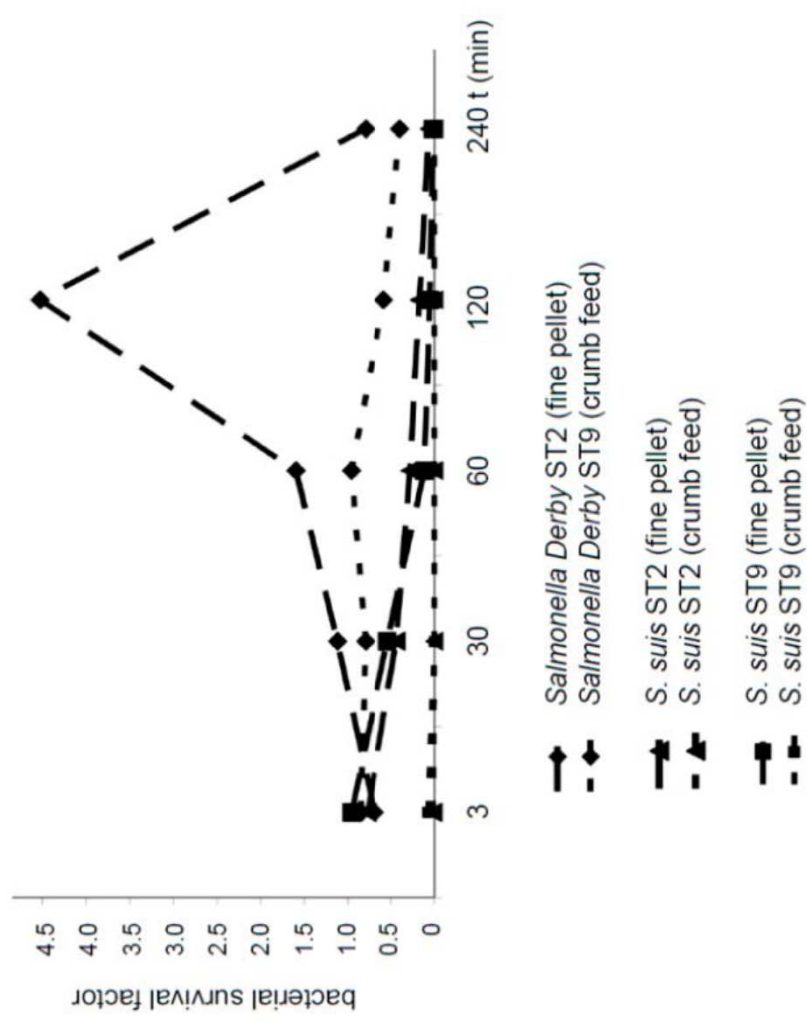
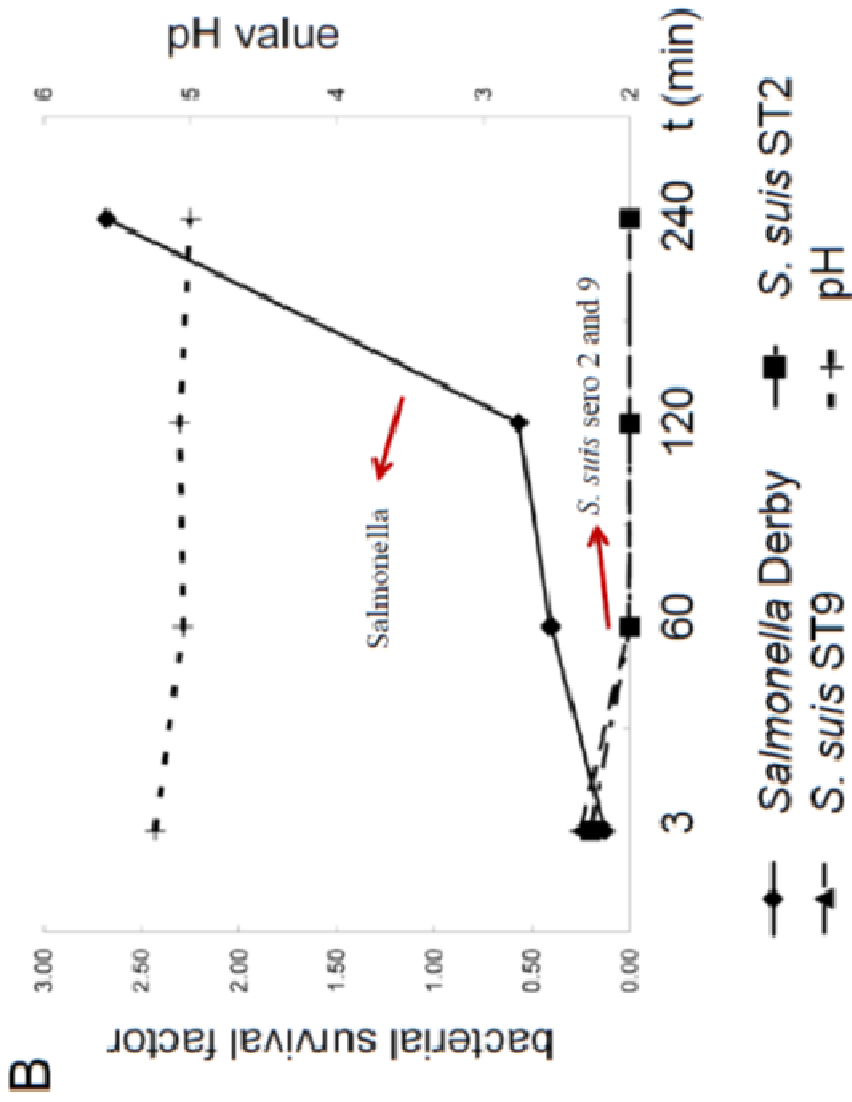
Streptococcus suis: possibile la trasmissione attraverso il tratto gastro-intestinale?

Elementi a favore:

Isolamento di *S. suis* dai linfonodi meseraici
Periodo di infezione: anoressia temporanea
Ipossia conseguente alla improvvisa ingestione di elevate quantità di alimento
Turbe flora intestinale
Infiammazione, stress
Aumento della permeabilità intestinale

Elementi contro:

Sopravvivenza di *S. suis* nel contenuto gastrico di suinetti
Stipiti virulenti di *Strep suis* somministrati al suinetto con l'alimento

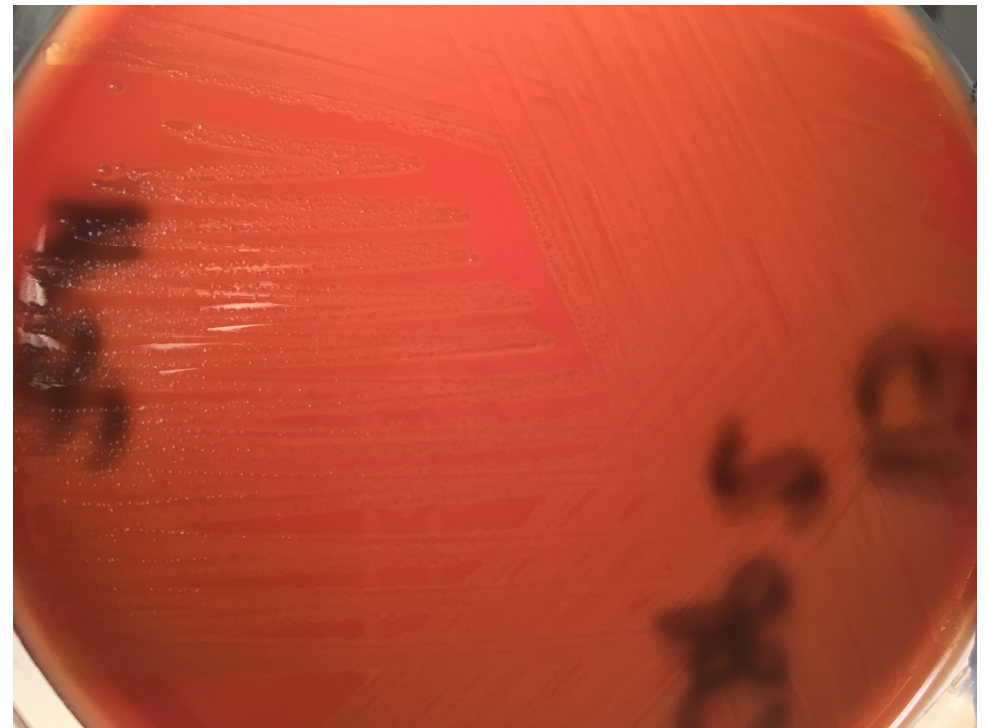


Courtesy of Prof. M. Gottschalk

Streptococcus suis: possibile la trasmissione attraverso il tratto gastro-intestinale?

Infezione sperimentale con il Sierotipo 2 e 9 a 10 miliardi di UFC per via endonasale non ha riprodotto la malattia né l'isolamento dai linfonodi.

Effetto indiretto?

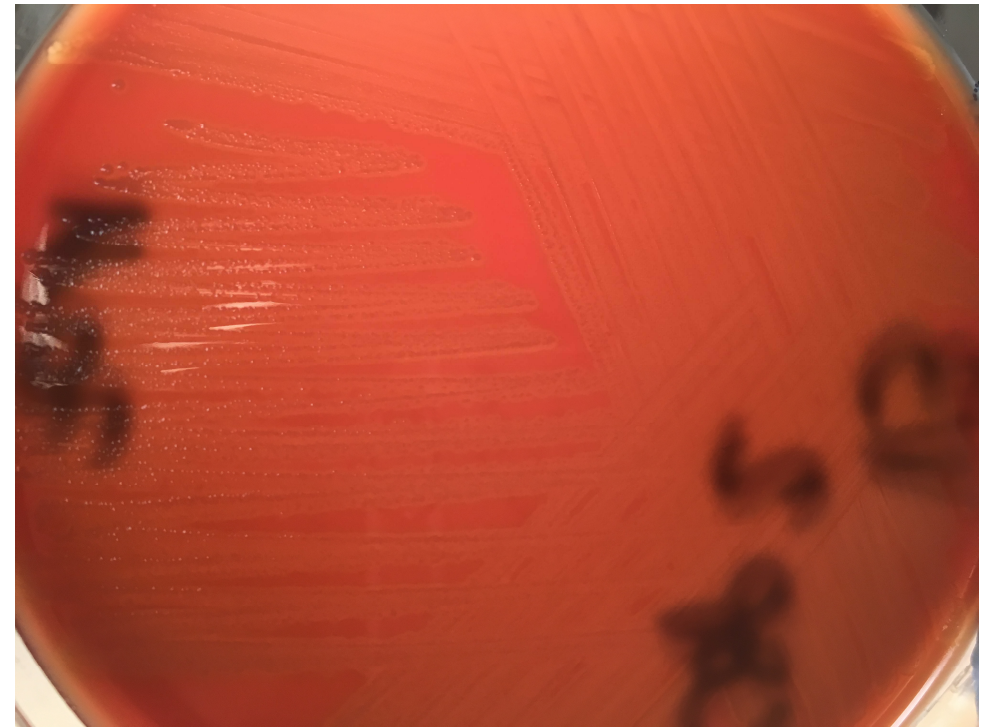


Streptococcus suis profilassi indiretta

La protezione non si realizza tra diversi sierotipi (no cross-protezione tra 2 e 9).

Sono disponibili solo vaccini stabulogeni

La presenza di anticorpi opsonizzanti correlata con la protezione

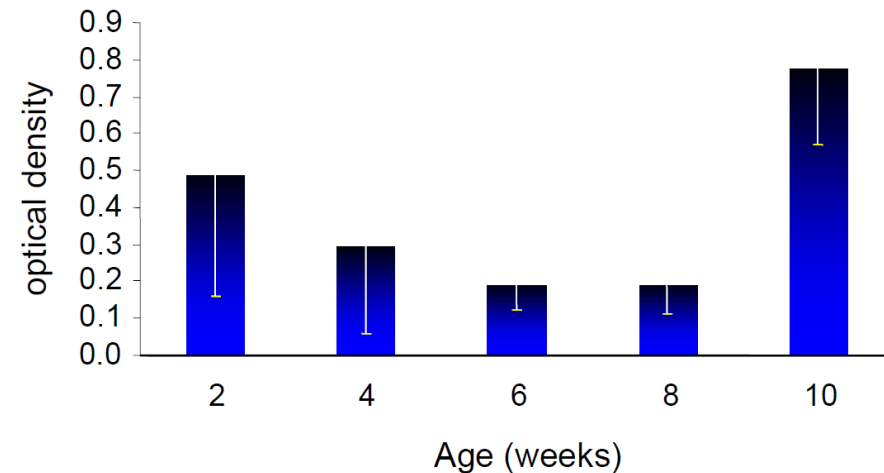


Streptococcus suis profilassi indiretta

Sono disponibili diversi protocolli vaccinali:
vaccinazione delle scrofe, dei suinetti o di
entrambi

Valutazione attraverso anticorpi opsonizzanti

Andamento anticorpi opsonizzanti in
allevamento endemicamente infetto



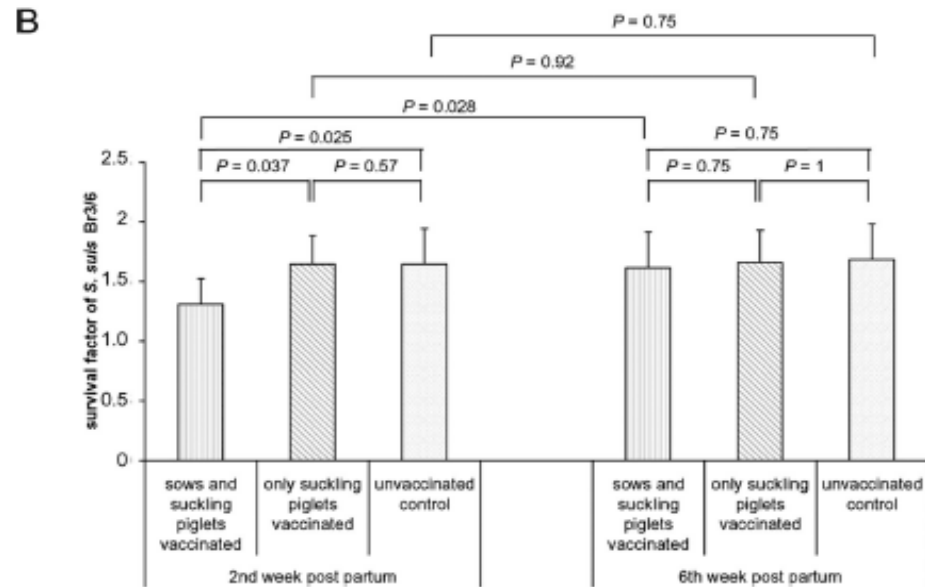
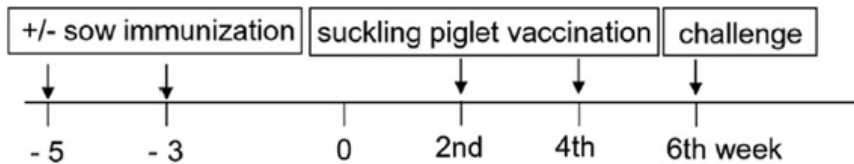
Courtesy of Prof. M. Gottschalk

Streptococcus suis profilassi indiretta

Sono disponibili diversi protocolli vaccinali:
vaccinazione delle scrofe, dei suinetti o di entrambi

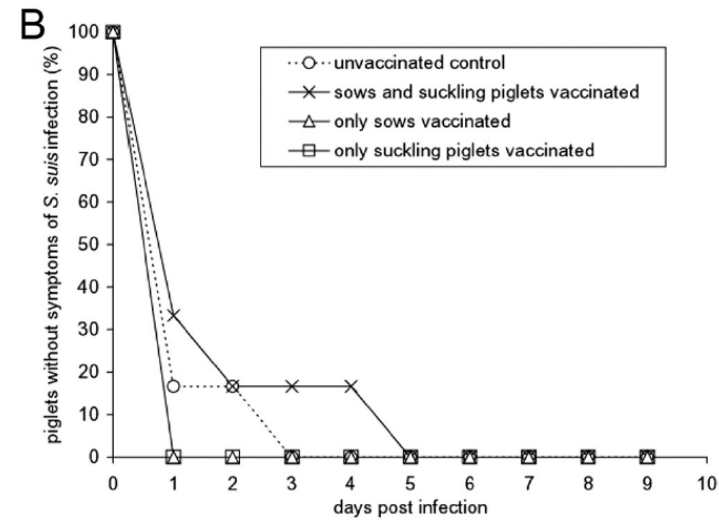
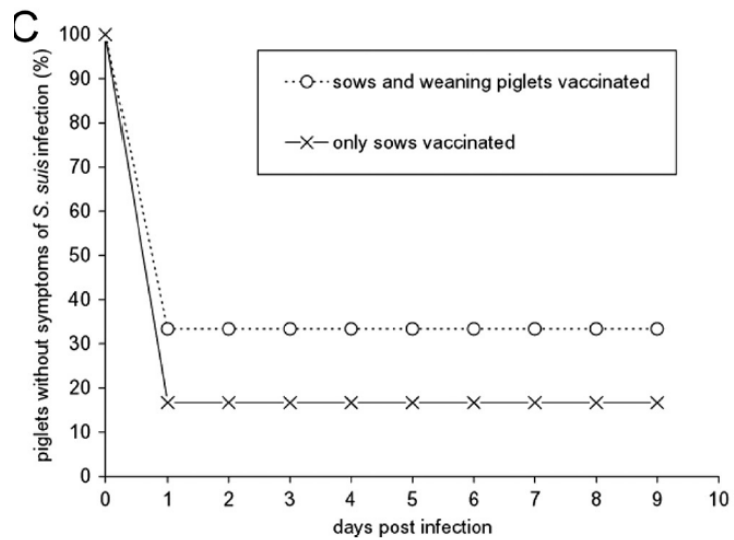
Valutazione attraverso anticorpi opsonizzanti

1st experiment:



Baums, Clin Vaccin Immunol, 2010

Streptococcus suis profilassi indiretta



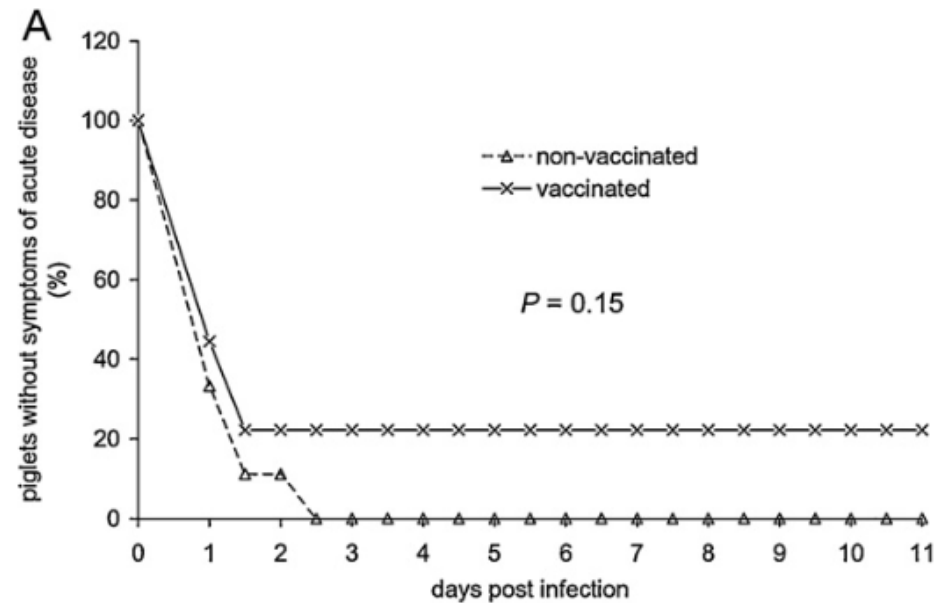
Baums, Clin Vaccin Immunol, 2010

Streptococcus suis profilassi indiretta: per il sierotipo 9?

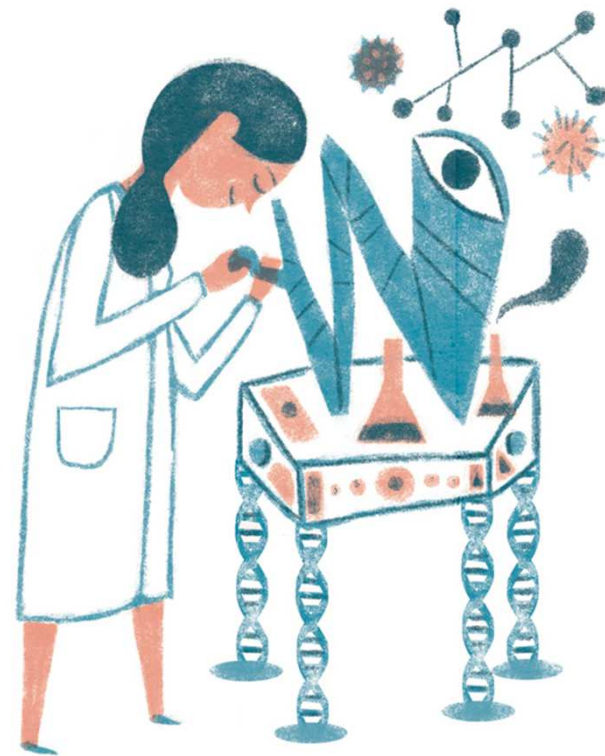
La maggior parte degli studi è stata condotta con ST 2

Vaccini inattivati con sierotipo 9 meno efficaci nel determinare una protezione

Emergenza del sierotipo 9 in Europa?



Buttner, Vet Immunol
Immunopath, 2012



Grazie per l'attenzione!