



Flora microbica utile e presenze di microrganismi antibiotico resistenti nella catena alimentare

Benianimo Cenci Goga e Paola Sechi



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

Introduzione



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

EUROPE'S FIGHT AGAINST ANTIMICROBIAL RESISTANCE



WHAT IS ANTIMICROBIAL RESISTANCE (AMR)?

Antimicrobials?

Substances used to treat a wide variety of infectious diseases in humans and animals. They:

- kill micro-organisms
- stop micro-organisms from growing and multiplying

Example: antibiotics



Antimicrobial resistance?

The ability of micro-organisms to withstand antimicrobial treatments.

Examples: MRSA (methicillin-resistant Staphylococcus aureus) commonly present on human skin and mucous membranes



Why is resistance growing?

- Overuse of antibiotics
- Misuse of antibiotics
- Spread through various routes



Effect of growing resistance?

- Treatment may become ineffective
- Serious risk to public health

Con l'adesa del 2 novembre 2017 tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano l'Italia si è dotata del primo Piano Nazionale di contrasto dell'antimicrobico-resistenza (PNCAR) 2017-2020.

Il PNCAR rappresenta lo strumento per tradurre in atto la strategia italiana.

Per far fronte all'aumento dell'antimicrobico resistenza (AMR) e della diffusione di microrganismi resistenti agli antibiotici, il PNCAR prevede uno sforzo di coordinamento nazionale, obiettivi specifici e azioni programmate, sia attraverso una sinergia tra i livelli nazionale, regionale e locale e i diversi attori chiave coinvolti, sia attraverso una governance in cui i ruoli delle istituzioni siano definiti chiaramente.

Entro 6 mesi dalla emanazione del PNCAR, è prevista la preparazione e l'adozione di un documento operativo che definisca le responsabilità delle diverse istituzioni.

Poiché il piano si prefigge di avere un impatto positivo concreto sulla salute umana, tra le azioni individuate spiccano l'identificazione e l'implementazione delle priorità da adottare ai vari livelli, per modificare l'attuale andamento in crescita del fenomeno dell'AMR e delle infezioni correlate all'assistenza.

Con Decreto del Direttore Generale della Prevenzione Sanitaria del 3 novembre 2017, è stato istituito un tavolo multistakeholder di coordinamento per l'implementazione e il monitoraggio del PNCAR, con il mandato di favorire il raggiungimento degli obiettivi previsti dal Piano. A questo tavolo si incontrano competenze ed expertise da diversi ambiti, sia a livello nazionale che regionale.

PNCAR



A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)

CAUSE:

- Inadeguato uso nel trattamento delle infezioni umane in ambiente ospedaliero e in comunità
- Impiego negli animali da reddito di antibiotici somministrati come auxinici o chemioterapici
- Comparsa di resistenze in batteri non patogeni per gli animali ma patogeni per l'uomo
- Batteri resistenti non patogeni veicolo di geni codificanti per AR
- Stipiti batterici resistenti a più classi di antibiotici

i.

CASO STUDIO

**Studio caso-controllo
sull'epidemiologia di stipiti
antibiotico resistenti di *Escherichia
coli* e *Enterococcus* spp. in pecore
e ungulati selvatici nel Parco
Nazionale dei Monti Sibillini.**

A CASE-CONTROL STUDY OF THE EPIDEMIOLOGY OF ANTIBIOTIC RESISTANT ESCHERICHIA COLI AND ENTEROCOCCUS SPP. IN SHEEP AND WILD UNGULATES AT THE PARCO NAZIONALE DEI MONTI SIBILLINI, ITALY

Soncini G¹, Sechi P², Pisano I², Monticelli C³, Nicchiarelli I³, Cenci Goga B², ¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano; ²Dipartimento di Scienze Biopatologiche, Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Perugia; ³Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Perugia



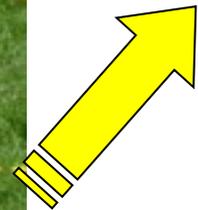
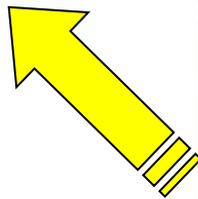
Cervus elaphus



Capreolus capreolus



Ovis aries



Farmaco Resistenza

✓ il trasferimento di geni che codificano per l'antibiotico resistenza

TRASFORMAZIONE
TRASDUZIONE
CONIUGAZIONE

✓ la mutazione di geni resistenti in varianti più resistenti

✓ *la pressione ambientale*

Obiettivo

L'**obiettivo** del studio è stato quello di effettuare uno studio caso-controllo sull'epidemiologia di stipti antibiotico-resistenti di *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. in pecore e ungulati selvatici nel Parco Nazionale dei Monti Sibillini, un ambiente naturale in cui gli ungulati selvatici non sono sottoposti a trattamenti antibiotici



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

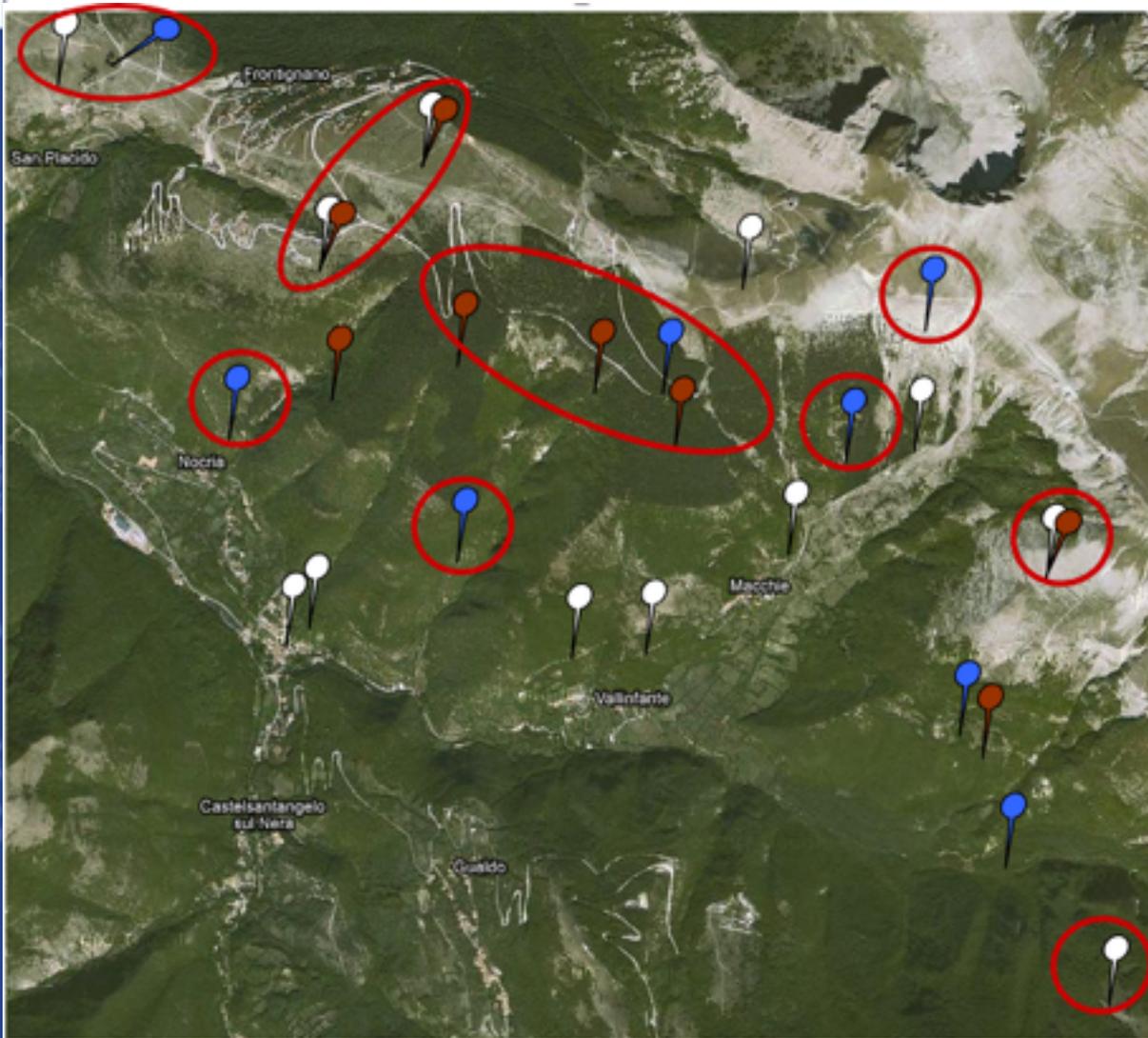
Materiali & Metodi

Superficie: 70000 ha

Ovini: 35000 capi



Area di studio



Ovini: 2919

Bovini: 51

Cavalli: 37

 Cervo e capriolo

 ovino

 acqua

Campionamento



113



- Isolamento di Enterobatteriacee e *Escherichia coli*: secondo UNI EN ISO 21528-1, UNI EN ISO 9308-1, UNI EN ISO 16649
- Isolamento di *Enterococcus* spp.: secondo ISO 7899

- Replica plating



- Antibiogramma



<i>E. coli</i>	AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC	
<i>Enterococcus</i> spp.	AMP	CIP	K	TE	CN	E	AMC	F	VA

PCR (protein chain reaction) per confermare resistenze fenotipiche

Risultati



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

Positività agli antibiotici di screening

Escherichia coli

n. campioni saggiati/n. campioni con crescita	AMP	TE	K
55/38	12	12	15
69,09%	31,58%	31,58%	39,47%

Feci di cervo

n. campioni saggiati/n. campioni con crescita	AMP	TE	K
22/19	12	8	13
86,36%	63,16%	42,11%	68,42%

Feci di pecora

Positività agli antibiotici di screening

Enterococcus spp.

n. campioni saggiati/n. campioni con crescita	AMP	TE	K
55/29	6	1	11
52.72%	20.69%	3.45%	37.93%

Feci di cervo

n. campioni saggiati/n. campioni con crescita	AMP	TE	K
22/8	4	1	3
36,36%	50%	12,5%	37,5%

Feci di pecora

Antibiogramma

Percentuale degli stipiti resistenti (numero stipiti/positivi)

Escherichia coli

AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC
39/12	39/0	39/3	39/5	39/1	39/0	39/11	39/12
30,77%	0	7,69%	12,82%	2,56%	0	28,21%	30,77%

Feci di cervo

AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC
20/9	28/1	28/9	28/10	17/4	28/0	28/18	28/7
45%	3,57%	32,14%	35,71%	23,53%	0	64,29%	25%

Feci di pecora

Enterococcus spp.

AMP	CIP	K	TE	CN	E	AMC	F	VA
19/0	19/3	19/19	19/1	19/14	19/1	19/0	0	19/3
0	15,79%	100%	5,26%	73,68%	5,26%	0	-	15,79%

Feci di cervo

AMP	CIP	K	TE	CN	E	AMC	F	VA
7/0	8/2	8/8	8/2	6/5	8/2	8/0	0	8/0
0	25%	100%	25%	83,33%	25%	0	-	0

Feci di pecora

Antibiogramma

Percentuale degli stipiti resistenti (numero stipiti/positivi)

Escherichia coli

AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC
5/4	5/0	5/2	5/4	5/4	5/3	5/3	5/1
80%	0	40%	80%	80%	60%	60%	20%

Enterococcus spp.

AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC
5/4	5/0	5/2	5/4	5/4	5/3	5/3	5/1
80%	0	40%	80%	80%	60%	60%	20%

Acqua di
abbeverata

Discussione e conclusioni



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA



Differenza tra *E.coli* resistenti alla tetraciclina e alla Kanamicina isolati da feci di pecora e di cervo è statisticamente significativa a livello di probabilità del 5%

Enterococcus spp.: 4 resistenti alla ciprofloxacina, 4 alla tetraciclina e 22 alla gentamicina

Desto preoccupazione anche il riscontro di 11 stipti di *Enterococcus* resistenti alla tetraciclina ed all'evidenziazione dei geni blaTEM ed ermB.

- pressione selettiva anche in ambienti naturali?
- Propagazione degli stipti selezionati dalle attività dell'uomo alla popolazione selvatica?

Nel nostro studio il livello di resistenza dei cervi(10,4%) sebbene basso appare esagerato e non spiegabile in assenza di Pressione Selettiva o di trasferimento dei geni dall'ambiente della pastorizia a quello dei selvatici

Possiamo ipotizzare nel nostro caso che le mosche possano fungere da serbatoio di batteri, oppure la transumanza(si verifica però solo per meno di un mese l'anno!!!) o uccelli e altri mammiferi selvatici che vengono più facilmente a contatto con le aree pascolate dalle pecore.



Questa ricerca rappresenta il tentativo di studiare la diffusione dell'antibiotico resistenza in ambienti naturali e la popolazione dei cervi dei Monti Sibillini può servire come allerta di pressione selettiva da antibiotici nell'ambiente, sia ad opera degli allevamenti limitrofi sia ad opera dell'ambiente urbano.

ii. Caso studio

Ricerca dei geni dell'antibiotico resistenza in api (*Apis mellifera ligustica*) allevate in Umbria

USO DEGLI ANTIBIOTICI IN APICOLTURA

Ad oggi, in Italia e nel territorio dell'Unione Europea, non risulta registrato nessun medicinale contenente antibiotico da utilizzare in apicoltura e l'impiego di antibiotici è vietato.

Difficoltà di conoscere con esattezza i tempi di sospensione rischio di residui nel miele

«La possibilità di utilizzare antimicrobici in apicoltura prospetta un quadro rovinoso. Le api, infatti, potrebbero diventare vettori di antibiotico resistenza [...]»-comunicato stampa del 13/05/2016 della FNOVI

IMPORTANZA ECOLOGICA DELLE API

L'ape è considerata un ottimo indicatore biologico dello stato di inquinamento del territorio in cui vive grazie a delle caratteristiche peculiari. Essa è considerata come ottimo indicatore biologico della contaminazione ambientale grazie a delle sue particolari caratteristiche:

- è facile da allevare ed ubiquitaria
- ha un tasso di riproduzione molto elevato
- esplora il territorio in cui vive alla ricerca di nettare, polline ed acqua intercettando, attraverso il corpo ricoperto di peluria, le particelle in sospensione nell'atmosfera

- collettore e disseminatore di geni di resistenza agli antibiotici

L'uso di antibiotici a scopo terapeutico nell'uomo e negli animali nel tempo può essere associato alla presenza di residui antimicrobici nell'ambiente e, in alcuni casi, accumulati dalle api da miele

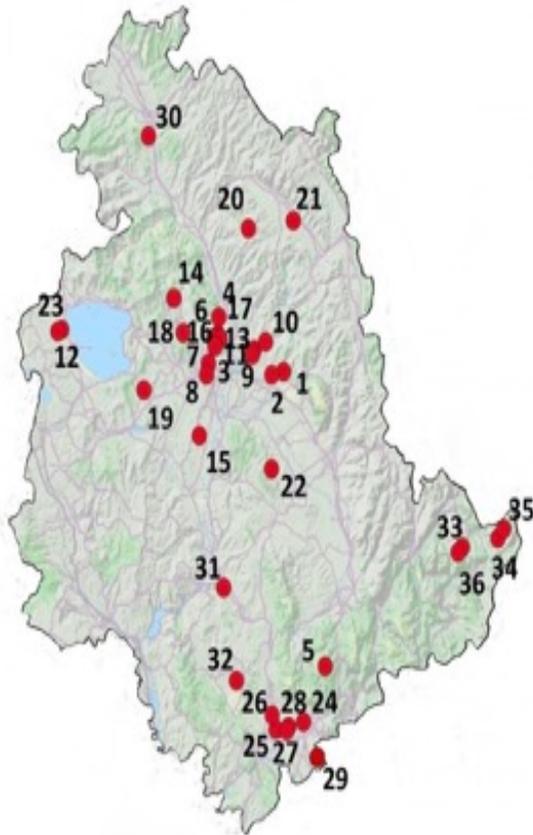
Obiettivo

Questo studio mira a valutare la presenza di alcuni geni responsabili dell'antibiotico resistenza in gruppi di api da miele con la ricerca diretta di alcuni dei geni responsabili della resistenza nei confronti degli aminoglicosidi, beta-lattamici, tetracicline e sulfamidici su 36 campioni di api, attraverso metodica PCR e sue varianti.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

CASISTICA E CAMPIONAMENTO



- La indagini sono state svolte su 36 campioni di api (*Apis mellifera ligustica*) prelevati in 35 diversi siti dell'Umbria, due campioni provengono dallo stesso sito ma sono stati prelevati in tempi diversi.

Materiali e metodi

- Estrazione del DNA da campioni formati da 10 gruppi di api, per un totale di 360 api.
- identificazione e amplificazione dei geni della resistenza agli antibiotici nei campioni di *Apis mellifera* con diverse coppie di primer

Materiali e metodi

Gene	Direction	Sequence (5'-3')	Fragment size of amplified products (bp)	PCR conditions	References
aph	Forward	5'-GAG-GAA-TAA-GGG-GAT-ACC-AAA-AAT-C	480	94°Cx5'; (94°Cx30'; 55°Cx30'; 72°Cx30') ↔ 25; 72°Cx7'	Kao et al., 2000
	Reverse	5'-GGG-TGCATT-TGT-GTT-AAA-AAA-CGG-G			
BlaZ	Forward	5'-ACTGACAGCGTGGTGGCTTTC	173	94°Cx4'; (94°Cx30'; 55°Cx30'; 72°Cx30') ↔ 30; 72°Cx7'	Kao et al., 2000
	Reverse	5'-TGACGCTTTTATGCGGAGCC			
tetM	Forward	5'-ACCGCGTATA-GTA-TTT-GAT-GGA-GT	1115	95°Cx3'; (95°Cx1'; 48°Cx1'; 72°Cx1') ↔ 35; 72°Cx10'	Gird Gopi et al., 2004
	Reverse	5'-GGT-TGCATA-ACC-GGA-TTT-TG			
TET M2	Forward	5'-CTTAGGAAAATGGGGATTCG	1009	95°Cx3'; (95°Cx1'; 48°Cx1'; 72°Cx1') ↔ 35; 72°Cx10'	Gird Gopi et al., 2004
	Reverse	5'-GGGGTGATACGATAAACG			
Sf 1	Forward	5'-CGGGGTGGGCAACCGAGCG	430	94°Cx3'; (94°Cx15'; 69°Cx30'; 72°Cx1') ↔ 30; 72°Cx7'	Kuzak et al., 2009
	Reverse	5'-GGGGATGGGGTGAAGTTCGG			
Sf 2	Forward	5'-GGGCTGAGGGGATGGGCTT	285	94°Cx3'; (94°Cx15'; 69°Cx30'; 72°Cx1') ↔ 30; 72°Cx7'	Redstrom e Svedberg, 1998
	Reverse	5'-GGCTTGTATGGGGGAGGGT			

Risultati

SAMPLE	APH	BLAZ	TETM	SUL-1	SUL-2
1	-	+	-	-	+
2	-	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+
6	-	+	-	+	+
7	-	+	-	+	+
8	-	-	-	+	-
9	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+
13	+	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	+
22	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	+
27	-	-	-	-	+
28	-	-	-	-	+
29	-	-	-	-	+
30	-	-	-	+	-
31	-	+	-	-	+
32	-	-	-	-	+
33	-	+	+	+	+
34	-	+	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-

Risultati

- Dei campioni testati, quattro erano positivi per il gene tet (M) (8,33%), due erano positivi per il gene aac (6')-af (2 ") (5,56%), otto per il gene blaZ (16,67%), dieci per sul1 (27,78%) e otto campioni hanno mostrato più resistenze ai farmaci.

Risultati

CAMPIONI	APH	BLAZ	TETM	SUL-1	SUL-2
1	-	+	-	-	+
2	-	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+
6	-	+	-	+	+
7	-	+	-	+	+
8	-	-	-	+	-
9	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+
13	+	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-

CAMPIONI	APH	BLAZ	TETM	SUL-1	SUL-2
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	+
22	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	+
27	-	-	-	-	+
28	-	-	-	-	+
29	-	-	-	-	+
30	-	-	-	+	-
31	-	+	-	-	+
32	-	-	-	-	+
33	-	+	+	+	+
34	-	+	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-

Discussione e conclusioni

- I risultati delle indagini contribuiscono a fornire informazioni sulla presenza dei geni che codificano per l'antibiotico resistenza nelle api della regione Umbria.
- Numerosi campioni risultano positivi, alcuni dei quali multiresistenti.
- Il riscontro di positività lascia supporre o un abuso diretto di farmaci, oppure la presenza nell'ambiente di germi che possiedono tali geni (e quindi un indice indiretto della presenza di antibiotici nell'ambiente).

Discussione e conclusioni

- Questo studio contribuisce al monitoraggio della presenza di geni di resistenza agli antibiotici negli insetti che non sono direttamente trattati con antibiotici ma che possono essere esposti attraverso l'ambiente.
- E' nota la persistenza di alcuni antibiotici, come le tetracicline, nell'ambiente e nelle arnie e, sebbene l'impiego non sia consentito, i nostri risultati lanciano un campanello di allarme.
- L'ape del miele rappresenta infatti un bioindicatore ambientale e una sentinella della presenza di geni di resistenza agli antibiotici nell'ecosistema, suggerendo un uso prudente dei composti antimicrobici.

Grazie per l'attenzione



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA