

COMPARAZIONE DEI PROFILI DI FARMACOSENSIBILITÀ DI *ESCHERICHIA COLI* ED *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLATI DA POLLI DA CARNE ALL'INIZIO E ALLA FINE DEL CICLO PRODUTTIVO

Cauci C., Brunetta R., Di Martino G., Zandonà L., Dalla Costa A., Capello K., Stefani A.L., Moronato M.L., Gobbo F., Catania S., Bano L., Bonfanti L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

Summary

This study evaluated the level of antimicrobial resistance (AMR) in commensal bacteria isolated from healthy male broilers at the beginning and at the end of the production cycle. Animals were housed in 3 sheds of the same farm during two periods of the year (summer and winter), for a total of 6 experimental groups. *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were isolated from the intestinal contents collected from 25 day old chicks conferred for routine health monitoring plan and from 25 carcasses per shed after slaughtering. Microdilution panels of 13 molecules for *E. coli* (Thermo Scientific™ Sensititre™ NARMS Gram Negative Plate) and of 16 molecules for *E. faecalis* (Thermo Scientific™ Sensititre™ Gram Positive MIC Plate) were used to assess the minimal inhibitory concentration (MIC). Animals were treated either with Amoxicillin acid or Trimethoprim-sulfadiazine. Results showed a high variability of AMR among sheds, but a low variability within the strains isolated from the same animal-group sample. In *E. coli*, a significant AMR increase was observed at the end of the production cycle for Gentamicin, Ampicillin, Streptomycin and Trimethoprim-sulfamethoxazole. On the other hand, a decrease was revealed for Amoxicillin-clavulanic acid and Ciprofloxacin. In *E. faecalis*, a significant AMR increase was observed for Chloramphenicol and Tylosin. Further research will be needed to clarify the exact interpretation of these results.

INTRODUZIONE

A livello nazionale vi è attualmente una carenza di dati sull'utilizzo di antibiotici nel settore avicolo nel corso degli ultimi anni associati all'antibioticoresistenza (AMR). Gli stessi dati ufficiali di AMR sono molto limitati, ma evidenziano una frequenza superiore al 95% delle resistenze ad almeno un principio attivo in *E. coli* (Ministero della Salute, 2016). EMA ed EFSA (2013) hanno individuato *E. coli* ed *Enterococcus faecalis* come utili indicatori di AMR negli animali da reddito, in quanto rappresentativi della popolazione di batteri commensali più frequentemente esposti agli antibiotici (AB).

Numerose evidenze scientifiche indicano un aumento di AMR nel pollo a seguito dei trattamenti (Simoneit et al., 2015), tuttavia questa connessione non è al momento supportata da dati certi. Alcuni studi hanno infatti evidenziato un aumento di AMR anche in capannoni in cui da oltre un anno non venivano somministrati antibiotici agli animali accasati (Smith et al., 2007; Ozaki et al, 2011). Gli studi sin qui condotti hanno valutato prevalentemente il livello di AMR a fine ciclo produttivo (ingrasso), mentre meno note sono le condizioni di partenza dei pulcini, legate alle condizioni di salute e gestione sia dei riproduttori sia degli incubatoi. Nei riproduttori i trattamenti

con AB potrebbero portare a una selezione di microrganismi resistenti che vengono trasmessi alla progenie, indipendentemente da una riduzione del consumo di AB nelle fasi d'ingrasso. Un riassortimento delle flore potrebbe avvenire anche in incubatoio qualora non venissero applicate accurate pratiche di disinfezione. Le resistenze agli antimicrobici possono essere valutate attraverso metodi genotipici o fenotipici. I primi ricercano direttamente geni di resistenza nei microrganismi in esame attraverso tecniche di biologia molecolare, i secondi si basano sul contatto diretto tra il microrganismo e l'antimicrobico e ne studiano il comportamento. Il test universalmente riconosciuto e codificato nella sua esecuzione da organismi scientifici internazionali (CLSI ed EUCAS) è il test della determinazione della minima concentrazione inibente (MIC). L'esistenza di breakpoint clinici definiti per le varie combinazioni specie animale (o uomo)/specie microbica/tipo di sindrome/antimicrobico, consentono di classificare il microrganismo testato come sensibile, intermedio o resistente a un determinato principio attivo, suggerendo al terapeuta il trattamento più appropriato. Inoltre, dato che il valore di MIC è espresso in termini quantitativi (mg/L o µg/mL), è possibile utilizzarlo per monitorare l'andamento delle farmacoresistenze nel tempo con osservazioni puntuali.

Obiettivo di questo studio era la valutazione dei profili di farmacosenibilità di *E. coli* ed *Enterococcus faecalis* isolati da gruppi commerciali di polli da carne a inizio e fine ciclo, provenienti da due diversi incubatoi e allevati in tre capannoni del medesimo allevamento.

MATERIALI E METODI

Azienda oggetto della prova

Il campionamento è avvenuto in due diversi periodi dell'anno (1. Giugno 2016 e 2. Dicembre 2016) presso una stessa azienda di polli da carne sita nel Nord-Est costituita da tre capannoni (A, B, C) che accasavano nella stessa settimana gruppi di circa 16.000-29.400 pulcini ROSS 308 a sessi misti (in rapporto circa 1:1). Sono stati identificati 6 gruppi sperimentali in base al capannone di provenienza e al periodo della prova: A1, B1, C1, A2, B2, C2. Secondo le consuete pratiche di allevamento per la macellazione delle femmine è stato effettuato uno sfoltimento a 33-35 giorni, mentre i maschi (sui quali sono stati effettuati i campionamenti previsti nel presente studio) sono stati macellati a 49-52 giorni di vita). I pulcini (45±4g) risultavano vaccinati per Malattia di Marek, Bronchite infettiva, Malattia di Newcastle. Gli animali di A1, B1, C1, C2 provenivano dal medesimo incubatoio X, mentre quelli di A2 e B2 dall'incubatoio Y. In tutti i capannoni la gestione dei parametri ambientali era effettuata tramite sistema centralizzato che garantiva il funzionamento degli impianti di raffrescamento, riscaldamento e ventilazione mantenendo la temperatura all'interno dei locali sulla base di intervalli di riferimento in funzione dello stadio di crescita. La lettiera era costituita da paglia pellettata sottoposta a fresatura quattro volte durante il ciclo. Sono stati utilizzati quattro tipi differenti di mangimi nel corso del ciclo in base all'età degli animali; il programma di alimentazione era il medesimo nei due periodi dell'anno.

Campionamento

All'arrivo in allevamento e prima dell'accasamento, il proprietario ha effettuato un controllo dello stato sanitario delle partite, conferendo all'IZSVe 25 pulcini raccolti

casualmente dai gruppi destinati a ciascun capannone. Le carcasse conferite sono state sottoposte ad esame anatomopatologico e a eventuali accertamenti virologici, batteriologici o istopatologici a seconda delle lesioni osservate. In caso di positività all'esame batteriologico, è stato eseguito il test di farmacosenibilità attraverso la determinazione della MIC di un panel predefinito di antimicrobici, nei confronti di specie microbiche ritenute clinicamente rilevanti. Gli animali sono stati conferiti al laboratorio entro 6 ore dall'accasamento. Il campionamento è stato ripetuto al momento della macellazione dei gruppi attraverso il prelievo del pacchetto intestinale di 25 soggetti maschi per capannone (3,2±0,2 kg). Il materiale è stato immediatamente congelato utilizzando ghiaccio secco.

Isolamento e identificazione batterica

Da ciascun pacchetto intestinale dei soggetti conferiti all'inizio e alla fine del ciclo produttivo, sono stati effettuati accertamenti batteriologici finalizzati all'isolamento di *E. coli* ed *Enterococcus* spp. Per l'isolamento di *E. coli* è stato impiegato il terreno differenziale denominato eosin methylene blue agar (EMB) (Beckton Dickinson) mentre per l'isolamento dei ceppi di *Enterococcus* spp. è stato utilizzato il terreno non selettivo Agar Sangue (Biolife) addizionato con esculina (ASE). Entrambi i terreni sono stati incubati a 37 °C, in condizioni di aerobiosi e ispezionati dopo 24 ore. In caso di modesta crescita batterica, l'incubazione veniva protratta per ulteriori 24 ore alle medesime condizioni. Le colonie cresciute su EMB con morfologia riferibile a *E. coli* e quelle cresciute su ASE costituite da microrganismi in grado di idrolizzare l'esculina evidenziabile sotto lampada di Wood, venivano isolate e identificate mediante MALDI TOF MS (Bruker Daltonics).

Per ciascun gruppo analizzato, sono state collezionate fino a un massimo di 50 colonie di *E. coli* e 50 di *E. faecalis*, di cui 25 isolate all'inizio e 25 alla fine del ciclo produttivo. Tali ceppi sono stati conservati in condizioni di congelamento (-80 °C).

Test di farmacosenibilità

Il test di farmacosenibilità è stato condotto su un massimo di 10 ceppi di *E. coli* e 10 di *E. faecalis* isolati ciascuno da singolo pacchetto intestinale all'inizio e alla fine del ciclo produttivo.

La farmacosenibilità dei ceppi collezionati è stata saggiata attraverso microdiluizioni in brodo di un panel predefinito di antimicrobici, al fine di individuare la minima concentrazione inibente (MIC). Per i ceppi di *E. coli* è stato utilizzato un kit commerciale miniaturizzato allestito con 13 molecole (Thermo Scientific™ Sensititre™ NARMS Gram Negative Plate) mentre per *E. faecalis* è stato impiegato un kit commerciale contenente 16 antimicrobici (Thermo Scientific™ Sensititre™ Gram Positive MIC Plate). Colistina è stata saggiata separatamente attraverso il metodo di determinazione della MIC descritto nel manuale CLSI M07-A10 (2015).

Analisi statistica

I profili di farmacosenibilità dei ceppi di *E. coli* e di *Enterococcus faecalis* sono stati sintetizzati in termini di percentuale di resistenza, applicando breakpoints

clinici per l'uomo (CLSI, 2016). Al fine di valutare una eventuale differenza significativa nei livelli di resistenza fra inizio e fine ciclo, è stato adottato un modello logistico a effetti misti, inserendo il capannone come cluster. A scopo descrittivo, sono state inoltre riportate le medie geometriche e i relativi intervalli di confidenza al 95% dei valori di MIC per singolo principio attivo.

RISULTATI

I profili di farmacosensibilità dei ceppi di *E. coli* sono riportati in Tab. 1, mentre quelli dei ceppi di *Enterococcus faecalis* sono riportati in Tab. 2. In tabella 3 sono riportati i trattamenti con antimicrobici effettuati nel corso dei cicli oggetto di studio e in quelli immediatamente precedenti. L'analisi statistica ha evidenziato variazioni significative nella distribuzione dei ceppi di *E. coli* resistenti a fine vs. inizio ciclo con una diminuzione nei confronti di Amoxicillina + ac. Clavulanico e Ciprofloxacina ($P < 0,05$), ma un aumento nei confronti di Gentamicina ($P < 0,05$), Ampicillina ($P < 0,05$), Streptomina ($P < 0,01$) e Trimetoprim-sulfametossazolo ($P < 0,001$).

L'analisi statistica ha evidenziato variazioni significative nella distribuzione dei ceppi di *E. faecalis* resistenti a fine vs. inizio ciclo con un aumento nei confronti di Cloramfenicolo ($P < 0,01$) e Tilosina ($P < 0,05$).

Tab. 1. Valori di resistenza e medie geometriche di MIC di 120 ceppi di *E. coli* isolati a inizio e fine ciclo in 6 capannoni di polli da carne.

principio attivo	% resistenti (min-max)		Media geometrica MIC (IC 95%)	
	inizio	fine	inizio	fine
Cefoxitina	12% (0%-40%)	3% (0%-10%)	4,33 (3,58-5,24)	3,68 (3,15-4,31)
Azitromicina	0%	0%	3,56 (3,08-4,11)	2,86 (2,47-3,31)
Cloramfenicolo	38% (0%-80%)	25% (10%-60%)	10,68 (8,45-13,49)	8,19 (6,58-10,19)
Tetraciclina	63% (10%-100%)	57% (20%-80%)	14,59 (11,24-18,93)	13 (9,94-17)
Ceftriaxone	5% (0%-10%)	5% (0%-10%)	0,31 (0,24-0,41)	0,32 (0,24-0,43)
Amoxi.-ac. clavulanico	20% (10%-50%)	3% (0%-20%)	7,46 (6,47-8,61)	6,81 (6,09-7,61)
Ciprofloxacina	58% (30%-100%)	38% (10%-70%)	0,2 (0,11-0,38)	0,06 (0,03-0,09)
Gentamicina	3% (0%-10%)	20% (0%-50%)	0,8 (0,66-0,97)	1,26 (0,89-1,78)
Ac. Nalidixico	48% (10%-100%)	37% (0%-70%)	9,19 (6,5-13)	5,72 (4,02-8,14)
Ceftiofur	5% (0%-10%)	5% (0%-10%)	0,57 (0,47-0,7)	0,52 (0,44-0,63)
Sulfisossazolo	0%	0%	191,71 (159,89-229,86)	222,86 (193,18-257,11)
Trimetoprim-sulfametossazolo	23% (0%-70%)	77% (30%-100%)	0,28 (0,19-0,41)	1,81 (1,24-2,63)
Ampicillina	73% (20%-100%)	88% (60%-100%)	16 (11,79-21,72)	23,43 (18,71-29,33)
Streptomina	30% (10%-80%)	60% (30%-90%)	12,13 (9,22-15,95)	23,7 (17,73-31,67)
Colistina	2% (0%-10%)	0%	0,30 (0,28-0,32)	0,28 (0,26-0,30)

Tab. 2. Valori di resistenza e medie geometriche di MIC di 102 ceppi di *E. faecalis* isolati a inizio e fine ciclo in 6 capannoni di polli da carne.

principio attivo	% resistenti (min-max)		Media geometrica MIC (IC 95%)	
	inizio	fine	inizio	fine
Tigeciclina	0%	0%	0,12 (0,11-0,14)	0,12 (0,12-0,13)
Eritromicina	90% (70%-100%)	100%	3,95 (2,9-5,37)	7,21 (6,41-8,11)
Tetraciclina	92% (90%-100%)	98% (90%-100%)	24,38 (18,71-31,77)	30,2 (26,91-33,9)
Ciprofloxacina	59% (40%-80%)	48% (20%-70%)	1,50 (1,36-1,65)	1,41 (1,28-1,55)
Cloramfenicolo	4% (0%-10%)	35% (0%-80%)	7,79 (7,28-8,33)	12,7 (10,75-15,01)
Penicillina	0%	2% (0%-10%)	2,19 (2,05-2,35)	2,43 (2,19-2,7)
Daptomicina	0%	2% (0%-10%)	1,79 (1,58-2,03)	2,3 (2,02-2,62)
Vancomicina	2% (0%-10%)	2% (0%-10%)	1,59 (1,37-1,84)	1,15 (1,03-1,29)
Streptomicina	2% (0%-10%)	47% (0%-90%)	526,11 (498,15-555,63)	977,76 (816,55-1170,79)
Nitrofurantoina	0%	0%	14,15 (12,53-15,98)	9,96 (8,64-11,48)
Tilosina tartrato	69% (40%-90%)	95% (80%-100%)	13,41 (9,3-19,32)	27,86 (23,8-32,61)
Gentamicina	0%	23% (10%-50%)	128	205,55 (165,8-254,83)
Lincomicina	100%	100%	8	8
Linezolid		3% (0%-10%)	1,82 (1,7-1,95)	1,69 (1,45-1,97)
Kanamicina	2% (0%-10%)	43% (20%-70%)	-	-
Quinopristina-Dalfopristina	100%	100%	8,97 (7,60-10,18)	12,84 (11,38-14,50)

Tab. 3. Principi attivi utilizzati nel corso dei cicli analizzati e in quelli immediatamente precedenti

Ciclo	Incubatoio d'origine	Trattamenti ciclo	Trattamenti ciclo precedente
A1	X	amoxicillina	sulfadiazina-trimetoprim; amoxicillina
B1	X	amoxicillina	sulfadiazina-trimetoprim; amoxicillina
C1	X	amoxicillina	lincomicina-spectomicina; amminosidina
A2	Y	sulfadiazina-trimetoprim	sulfadiazina-trimetoprim
B2	Y	sulfadiazina-trimetoprim	sulfadiazina-trimetoprim
C2	X	sulfadiazina-trimetoprim	-

DISCUSSIONE

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di indagare i livelli di AMR in batteri commensali indicatori (*E. coli*, *E. faecalis*) isolati da polli da carne all'inizio e alla fine di 6 cicli produttivi. I risultati indicano una notevole variabilità tra capannoni,

mentre è stata rilevata una relativa omogeneità tra ceppi isolati all'interno dello stesso gruppo di soggetti. Questo risultato, considerando le condizioni ambientali molto simili (capannoni di uno stesso allevamento) conferma quanto evidenziato in precedenti lavori riguardo la complessità dei meccanismi di trasferimento dei fattori di resistenza, in connessione con fattori ambientali e non sempre associabili in modo chiaro ai trattamenti effettuati.

I ceppi commensali che colonizzano l'intestino del pollo possono derivare dall'assunzione di flore batteriche dei riproduttori presenti sul guscio, oppure possono essere assunti dall'ambiente durante le successive fasi d'accrescimento. Le capacità di colonizzazione dei singoli ceppi non sono note, ma si sa che i trattamenti antimicrobici possono indubbiamente indurre una selezione dei ceppi che colonizzeranno l'intestino dell'ospite. A questo proposito si è osservato che un uso frequente di amoxicillina risultasse associato a un aumento dei livelli di resistenza per l'ampicillina (aminopenicillina della medesima classe farmacologica). Inoltre, un uso altrettanto frequente di sulfadiazina-trimetoprim risultava associato a un aumento dei livelli di resistenza dei ceppi verso una associazione della stessa classe farmacologica (Trimetoprim-sulfametoxazolo), che sono passati da 23% all'inizio del ciclo a 77% al termine.

Altra differenza significativa è stata registrata per entrambi gli aminoglicosidi testati nel presente studio (gentamicina e streptomina), a testimonianza di una resistenza crociata reale per tali molecole. Questa differenza nelle percentuali di resistenza non trova spiegazione nei trattamenti terapeutici dato che l'unico aminoglicoside impiegato (aminosidina) è stato somministrato solo in un ciclo produttivo. La vicinanza tra i valori della media geometrica delle MIC registrate all'inizio e alla fine del ciclo produttivo, suggerisce comunque una variazione sostanzialmente modesta dei valori di MIC. Non sono state osservate differenze significative dei profili di farmacoresistenza nei confronti di molecole ritenute criticamente importanti in terapia umana (CIA) quali cefalosporine di III e IV generazione, fluorchinoloni di II generazione e colistina.

In questo studio il dato convertito in termini di resistente/sensibile è stato accompagnato dai valori di medie geometriche di MIC per ciascun principio attivo. Questa scelta mette in evidenza la potenzialità di questa metodica di rendere più sensibile e graduata la valutazione della risposta agli antimicrobici, identificando scostamenti anche minimi rispetto alla media.

CONCLUSIONI

Lo studio ha confermato la complessità dei fenomeni di resistenza, non sempre associabili in modo chiaro agli specifici trattamenti effettuati sugli animali. È stata tuttavia evidenziata la necessità di implementare a livello di filiera dei protocolli efficaci di contrasto dell'AMR in termini di sanificazione ambientale (strategia di non semplice realizzazione), ma soprattutto di gestione sanitaria dei riproduttori (fattibilità limitata dall'assenza delle linee gran parentali a livello nazionale) e a livello di incubatoio, in quanto per numerose molecole si è evidenziato un elevato livello di resistenza nei pulcini di un giorno, omogeneamente distribuito nel gruppo, che è poi risultato inferiore a fine ciclo. Quest'ultima osservazione suggerisce una maggiore attenzione nel cercare di diminuire le resistenze soprattutto nei gruppi gran-parentali e parentali.

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standard, tenth ed. CLSI document M07-A10, vol. 35, No. 2., Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2016). M100-S26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 26th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
3. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA BIOHAZ Panel (European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards) and CVMP (EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use). (2017). ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA Journal* 2017;15(10):5017, 70 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017>.
4. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(2):4036, 178 pp., doi:10.2903/j.efsa.2015.4036
5. Ministero della Salute. (2014). Relazione sulla resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali - anno 2014 - settore avicolo. Disponibile online: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2476_allegato.pdf
6. Ozaki H, Esaki H, Takemoto K, Ikeda A, Nakatani Y, Someya A, Hirayama, N, and T Murase. (2011). Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet. Microbiol.* 150: 132-139.
7. Simoneit C, Burow E, Tenhagen BA and A Käsbohrer. (2015). Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken—a systematic review. *Prev. Vet. Med.* 118: 1-7.
8. Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL and MD Lee. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 73:1404-1414.