

## DIFFUSIONE DEI GENI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA (ARGS) IN ALLEVAMENTI AVICOLI DEL CENTRO ITALIA

Smoglica C.<sup>1</sup>, Di Francesco C.E.<sup>1</sup>, Profeta F.<sup>2</sup>, Muhammad F.<sup>1</sup>, Di Giannatale E.<sup>2</sup>, Toscani T.<sup>3</sup>, Marsilio F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Loc. Piano D'Accio, 64100 Teramo*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Via Campo Boario, 64100 Teramo;*

<sup>3</sup> *Gesco Cons. Coop a r.l., Via Bacchelli 1, Loc. Casemolino, 64020, Castellalto, Teramo.*

### Summary

In this study a biomolecular investigation for antimicrobial resistances genes (ARGs) was carried out starting from n. 38 litter samples collected from n. 6 poultry and n. 2 turkey flocks. Multiplex PCR for amplification of ARGs against tetracycline, lincomycin, chloramphenicol, aminoglycosides and colistin allowed to detect all genes under study except for *tet(C)* e *tetB(P)* (tetracycline), *aadB* e *aac(3) IV* (aminoglycosides), *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* (colistin). The prevalent genes belong to tetracycline, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(M)* e *tet(K)*, and streptomycin, *aadA2*, in agreement with the data regarding the use of antibiotics in veterinary medicine. A non-invasive sampling method, along with a rapid detection of antimicrobial resistance, could allow to get information regarding the trends on ARGs in farms, the spillover of specific ARGs into the environment and the possibility emergence of ARB in the digestive tract of animals.

### INTRODUZIONE

L'uso eccessivo di molecole antimicrobiche rappresenta ancora una delle principali cause dell'instaurarsi dell'antimicrobico resistenza (AMR), responsabile ogni anno di circa 25.000 decessi solo in Europa (Marston *et al.*, 2016).

In base ai dati più recenti, il consumo di antibiotici nel mondo è aumentato del 65% negli anni compresi tra il 2000 e il 2015, raggiungendo i 42 bilioni di dosi definite giornaliere (*defined daily doses* o DDDs) (Cycoń *et al.*, 2019). In Europa, i principali Paesi consumatori di antibiotici nel 2017 sono stati Spagna, Francia e Cipro, al contrario Italia, Finlandia, Germania, Lussemburgo, Norvegia, Svezia e Regno Unito registrano una riduzione significativa del loro utilizzo (ECDC, 2018).

Il trasferimento orizzontale di geni di resistenza (*Antibiotic Resistance Genes* o ARGs) è un importante fattore di disseminazione dell'AMR nell'ambiente, in grado di portare alla selezione e al mantenimento di batteri multi-resistenti. A questo meccanismo si associa la pressione selettiva esercitata dai residui degli antibiotici che vengono eliminati nelle acque e nel terreno attraverso i reflui fognari e le deiezioni animali, spesso utilizzate come fertilizzanti in agricoltura (Bouki *et al.*, 2013; Daghrrir and Drogui, 2013; Wu *et al.*, 2014).

I sistemi di monitoraggio più comuni per valutare la diffusione di batteri multi-resistenti e dei relativi geni di AMR sono basati sull'isolamento di singole specie batteriche a partire da campioni biologici e ambientali e sulle relative prove di antibiogramma. Tale approccio, oltre a richiedere tempi di esecuzione relativamente lunghi, permette

di evidenziare un limitato numero di batteri resistenti, che rappresentano solo una parte del microbiota intestinale e quindi del resistoma, inteso come il complesso degli ARGs che conferiscono AMR ai batteri stessi (Munk *et al.*, 2018).

Al contrario, la ricerca diretta di sequenze specifiche per ARGs mediante prove biomolecolari potrebbe rappresentare uno strumento alternativo di monitoraggio e verifica della presenza di AMR in ambienti ad alta densità microbica come gli allevamenti intensivi. Tale approccio potrebbe aiutare anche ad evidenziare i cambiamenti che possono verificarsi nella composizione del resistoma del tratto intestinale degli animali, in seguito all'applicazione di diverse misure di controllo e profilassi delle infezioni.

Scopo di questo lavoro pertanto è stato di valutare in allevamenti tradizionali di broiler e tacchini del Centro Italia la distribuzione degli ARGs associati alla resistenza nei confronti delle più comuni classi di antibiotici utilizzate nella terapia delle infezioni batteriche.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Nel periodo compreso tra Novembre 2015 e Dicembre 2016 sono stati campionati n. 6 allevamenti di broiler (Allevamenti B1-B6) e n. 2 di tacchini (Allevamenti T1 e T2) per un totale di n. 8 aziende localizzate in provincia di Teramo.

Per ogni allevamento sono stati prelevati campioni di lettiera mediante sovrascarpe (Agritamp plus02; Biogenetics, Padova, Italia) conformemente a quanto previsto dal Piano nazionale di controllo delle Salmonellosi negli avicoli 2016/2018 ([http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2453\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2453_allegato.pdf)), a inizio ciclo di produzione (indicativamente a partire dai 10 giorni di età degli animali), a metà ciclo, e in prossimità della macellazione, per un totale di n. 38 campioni.

### *Prove biomolecolari*

Ciascun campione è stato diluito al 10% p/v in soluzione fisiologica sterile, quindi miscelato mediante Stomacher (VWR International pbi, Milano, Italia) e sottoposto a trattamento termico a 75° C per 20 minuti. Successivamente 300 µl di ciascuna soluzione sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA mediante Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit, secondo le istruzioni della ditta produttrice (Promega, Italia).

Per lo *screening* biomolecolare sono stati allestiti protocolli di multiplex PCR per la ricerca degli ARGs specifici per tetracicline [*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tetB(P)*, *tetA(P)*], lincomicina [*lnu(A)*, *lnu(B)*], cloramfenicolo [*CatA1*], aminoglicosidi [*aadA2*, *aadB*, *aac(3)IV*] e colistina [*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*] (Lyras and Rood, 1996; Bozdogan *et al.*, 1999; Lina *et al.*, 1999; Trzcinski *et al.*, 2000; Aminov *et al.*, 2001; Gevers *et al.*, 2003; Kozak *et al.*, 2009; Kikuvu *et al.*, 2010; Prasertsee *et al.*, 2016; Rebelo *et al.*, 2018).

## RISULTATI

Tutti gli allevamenti sono risultati positivi a uno o più ARGs, con la più elevata positività multipla (n. 9/19 ARGs) riscontrata nell'allevamento B1 (**Tabella 1**). Negli allevamenti di broiler sono risultati presenti gli ARGs di tutte le classi anticorpali, ad eccezione dei geni per la colistina, mentre nei tacchini non sono risultati evidenziabili

i geni del cloramfenicolo oltre che della colistina.

Più in dettaglio, i geni *tet(A)*, *tet(B)* e *CatA1* sono risultati presenti esclusivamente nei broiler e sempre nella stessa specie il numero di campioni positivi per i geni *tetA(P)*, e *lnu(A)* risulta maggiore rispetto ai tacchini. Per entrambe le specie, infine, non sono stati amplificati i geni *tet(C)* e *tetB(P)*, *aadB* e *aac(3)IV*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*.

Il numero più elevato di campioni positivi (35/38; 92%) è stato ottenuto per il gene *aadA2* coinvolto nella resistenza nei confronti della streptomicina (Nhung et al., 2017) e a seguire per gli altri ARGs delle tetracicline, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(M)* e *tet(K)* (Tabella 2).

**Tabella 1.** Percentuali di positività ottenute nei singoli allevamenti per gli ARGs amplificati mediante multiplex PCR.

Allevamento	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>lnu(B)</i>	<i>CatA1</i>	<i>aadA2</i>
B1	100%	33%	67%	100%	0%	100%	67%	33%	100%	100%
B2	100%	17%	17%	50%	17%	0%	17%	0%	67%	100%
B3	50%	100%	0%	50%	0%	0%	50%	0%	100%	100%
B4	0%	0%	20%	0%	80%	80%	0%	60%	40%	80%
B5	0%	0%	0%	100%	50%	50%	25%	50%	0%	75%
B6	0%	0%	50%	50%	50%	75%	25%	0%	0%	75%
T1	0%	0%	50%	90%	50%	50%	10%	20%	0%	100%
T2	0%	0%	25%	75%	75%	50%	0%	50%	0%	100%

**Tabella 2.** Numero di campioni risultati positivi alle prove di multiplex PCR negli allevamenti di broiler e tacchini per ogni ARG riscontrato

	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>lnu(B)</i>	<i>CatA1</i>	<i>aadA2</i>
<b>Allevamenti Broiler</b>	10	4	6	13	9	12	6	6	11	21
<b>Allevamenti Tacchini</b>	0	0	6	12	8	7	1	4	0	14
<b>Totale</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>25</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>35</b>

## DISCUSSIONE

L'indagine condotta, seppur preliminare, mostra un'ampia diffusione degli ARGs negli allevamenti campionati, con lievi differenze per la classe di antibiotici investigati e la specie coinvolte.

Gli ARGs risultati più presenti nelle lettiera sono quelli per gli aminoglicosidi e le tetracicline, in linea con i dati disponibili sui consumi di molecole antimicrobiche, che indicano proprio questi antibiotici tra i più utilizzati in campo veterinario (Munk et al., 2018; van Duijkeren et al., 2019).

È da considerare che la maggior parte degli ARGs indagati sono di origine plasmidica, potenzialmente trasmissibili per via orizzontale, in associazione ad altri geni di resistenza e pertanto trasferibili anche a batteri patogeni per il pollame e per l'uomo (Argudín *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda le specie avicole, studi recenti evidenziano profili di resistenza nei confronti delle tetracicline che coinvolgono l'86% e il 47% dei ceppi di *Salmonella enterica* ed *E. coli*, isolati da carcasse di polli e tacchini (Mehdi *et al.*, 2018; Roth *et al.*, 2019).

Infine, la resistenza nei confronti della colistina, considerata emergente per alcuni Paesi europei tra cui l'Italia, non sembra essere confermata dal presente studio (Munk *et al.*, 2018).

I dati riportati sono stati ottenuti da campioni ambientali prelevati tra il 2015 e il 2016, quindi, potrebbero non rispecchiare la situazione attuale. Pertanto, sarebbe utile ripetere lo *screening* molecolare, coinvolgendo un numero superiore di allevamenti, al fine di evidenziare eventuali cambiamenti nei livelli di contaminazione da ARGs. La loro diffusione, infatti, potrebbe essere correlata a fattori come il consumo di antibiotici, che negli ultimi anni, soprattutto nel settore avicolo, ha mostrato una forte contrazione (Caucci *et al.*, 2019), e a nuove tipologie di allevamento come le linee *antibiotic-free*.

## CONCLUSIONI

Lo screening molecolare applicato in questo studio, associato ad un metodo di campionamento rapido e non invasivo, può rappresentare uno strumento aggiuntivo di monitoraggio dell'AMR, in grado di fornire ulteriori informazioni sulla reale distribuzione del fenomeno nelle produzioni avicole.

***Studio condotto nell'ambito del Progetto "Demetra" (Dipartimenti di Eccellenza 2018 – 2022, CUP\_C46C18000530001), finanziato dal Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca***

## BIBLIOGRAFIA

1. AAVV. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption. In ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC, 2018.
2. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N and Mackie RI. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:22-32.
3. Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, Nonhoff C and Roisin S. (2017). Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics (Basel)*. 6(2). pii: E12.
4. Bouki C, Venieri D and Diamadopoulos E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91: 1-9.
5. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo M, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ and Leclercq R. (1999). A new resistance gene, *linB*, conferring resistance

- to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 925–929.
6. Caucci C, Di Martino G, Dalla Costa A, Santagiuliana M, Lorenzetto M, Capello K, Mughini-Gras L, Gavazzi L and Bonfanti L. (2019). Trends and correlates of antimicrobial use in broiler and turkey farms: a poultry company registry-based study in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* pii: dkz212.
  7. Cycoń M, Mroziak A and Piotrowska-Seget Z. (2019). Antibiotics in the Soil Environment-Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Front. Microbiol.* 10: 338.
  8. Daghbir R and Drogui P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.* 11: 209-227.
  9. Gevers D, Danielsen M, Huys G and Swings J. (2003). Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1270-1275.
  10. Kikui GM, Ombui JN and Mitema ES. (2010). Serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolates from pigs at slaughter in Kenya. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4(4): 243-8.
  11. Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ and Jardine C. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(3): 559-66.
  12. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F and Etienne J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1062-1066.
  13. Lyras D and Rood JI. (1996). Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(11): 2500-2504.
  14. Marston HD, Dixon DM, Knisely JM, Palmore TN and Fauci AS. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA.* 316(11): 1193-1204.
  15. Mehdi Y, Létourneau-Montminy MP, Gaucher ML, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Brar SK, Côté C, Ramirez AA and Godbout S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim. Nutr.* 4(2): 170-178.
  16. Munk P, Knudsen BE, Lukjancenko O, Duarte ASR, Van Gompel L, Luiken REC., Smit LAM, Schmitt H, Garcia AD, Hansen RB, Petersen TN, Bossers A, Ruppé E; EFFORT Group, Lund O, Hald T, Pamp SJ, Vigre H, Heederik D, Wagenaar JA, Mevius D and Aarestrup FM. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nat. Microbiol.* 3(8): 898-908.
  17. Nhung NT, Chansiripornchai N and Carrique-Mas JJ. (2017). Antimicrobial Resistance in Bacteria Poultry Pathogens: A review. *Front. Vet. Sci.* 4:126.
  18. Prasertsee T, Khantaprab N, Yamsakul P, Santiyanont P, Chokesajjawatee N and Patchnee P. (2016). Repetitive sequence-based PCR fingerprinting and the relationship of antimicrobial-resistance characteristics and corresponding genes among *Salmonella* strains from pigs production. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 6(5): 390-395.

19. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, De Frutos Escobar C, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A and Hendriksen RS. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill.* 23(6).
20. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C and Domig KJ. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult. Sci.* 98(4): 1791-1804.
21. Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W and Dowson CG. (2000). Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 763-770.
22. van Duijkeren E, Schwarz C, Bouchard D, Catry B, Pomba C, Baptiste KE, Moreno MA, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Wester AL, Ignate K, Kunsagi Z and Jukes H. (2019). The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* pii: dkz161.
23. Wu X-L, Xiang L, Yan Q-Y, Jiang Y-N, Li Y-W, Huang X-P, Li H, Cai QY and Mo CH. (2014). Distribution and risk assessment of quinolone antibiotics in the soils from organic vegetable farms of a subtropical city, Southern China. *Sci. Total Environ.* 487: 399-406.