

PROFILI FENOTIPICI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI *ESCHERICHIA COLI* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATI DA VOLATILI PET

Dipineto L., Varriale L., Russo T.P., Santaniello A., Borrelli L., Minichino A., Pace A., Menna L.F., Fioretti A.

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via F. Delpino 1, 80137 (NA), Italia

Summary

Antibiotic resistance is one of the biggest public health challenges of our time. Several studies have been conducted on livestock showing a correlation between the systemic use of antibiotics and the onset of resistant bacterial strains. In contrast, although companion birds are historically considered as an important reservoir for human health threats, little information on the antimicrobial resistance in these species is available in the literature. Therefore, this study was aimed at evaluating the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from 755 companion birds. Cloacal samples were collected for *E. coli* and *P. aeruginosa* isolation and all isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing. *P. aeruginosa* was isolated in 59/755 (7.8%) samples, whereas *E. coli* was isolated in 236/755 (31.3%) samples. Most strains showed multidrug resistance. This study highlights that companion birds may act as potential reservoirs carrying antimicrobial resistance genes which could transfer directly or indirectly to humans and animals, and from a One Health perspective this risk should not be underestimated.

INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza (AMR) è un fenomeno naturale che compromette il trattamento empirico delle infezioni e si traduce in una mancanza dell'efficacia degli antibiotici e in un aumento delle spese mediche [1]. La comparsa di batteri resistenti è un problema globale che sta mettendo in pericolo l'efficacia degli antibiotici che hanno trasformato la medicina e salvato milioni di vite. La crisi legata alla AMR è stata attribuita al cattivo uso e all'abuso di questi farmaci, nonché alla mancanza di sviluppo di nuovi farmaci da parte dell'industria farmaceutica a causa di incentivi economici ridotti e requisiti normativi farraginosi [2]. Sono stati condotti diversi studi sugli animali da reddito che mostrano una stretta correlazione tra l'uso sistemico di antibiotici e l'insorgenza di ceppi batterici resistenti [3]. Al contrario, sebbene gli uccelli selvatici siano storicamente considerati un eccellente reservoir animale, in letteratura sono disponibili scarse informazioni sulla AMR negli uccelli da compagnia [4]. Questo topic, infatti, è stato ampiamente studiato negli uccelli selvatici, in particolare nei rapaci, negli uccelli acquatici e nei passeriformi, evidenziandone il ruolo come serbatoio di ceppi batterici multiresistenti e sottolineandone il rischio per la salute umana e animale [5]. Alla luce di tali considerazioni, il presente studio è stato intrapreso con lo scopo di valutare la resistenza antimicrobica di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* isolati da uccelli da compagnia al fine di comprendere meglio il ruolo epidemiologico di queste specie nella diffusione di batteri multiresistenti tra animali, uomo e ambiente.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Durante il periodo Gennaio 2016-Dicembre 2018, sono stati esaminati 735 uccelli da compagnia clinicamente sani su ciascun dei quali veniva effettuato un tampone cloacale. I volatili appartenevano alle seguenti famiglie e specie: Fringillidae (*Carduelis carduelis*, *Serinus canaria*), Estrildidae (*Erythrura gouldiae*, *Lonchura striata domestica*, *Taeniopygia guttata*), Psittacidae (*Melopsittacus undulatus*, *Agapornis roseicollis*) e Columbidae (*Columba livia domestica*). Tutti gli uccelli esaminati erano selezionati da differenti allevamenti della regione Campania. Come affermato dai rispettivi proprietari, gli animali non ricevevano alcun trattamento antibiotico al momento del campionamento e nei precedenti tre mesi. Ogni campione veniva conservato in terreno di trasporto a +4 °C, inviato al laboratorio e analizzato entro 2 ore dal prelievo.

Isolamento e identificazione dei batteri

I tamponi cloacali venivano inoculati in Buffered-Peptone Water (BPW, Oxoid, Milano) e incubati a 37 °C per 24 ore. Le colture venivano seminate su MacConkey agar e Cetrimide agar (Oxoid, Milan), e incubate a +37 °C per 24 ore. Le colonie “sospette” di *E. coli* venivano seminate su Tryptone Bile X-Glucuronide e incubate a +42 °C per 24 ore. Tutti gli isolati venivano identificati biochimicamente mediante il sistema miniaturizzato API 20E (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France); le colonie “sospette” di *Pseudomonas* spp., invece, venivano sottoposte al test dell’ossidasi e processate biochimicamente attraverso il sistema API 20 NE (BioMérieux).

Antibiogramma

Su tutti gli isolati si eseguiva un antibiogramma mediante la metodica di Kirby-Bauer secondo le linee guida del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2012) [6]. Gli antibiotici testati erano rappresentati da amoxicillina/acido clavulanico (AMC; 30 µg), sulfametossazolo-trimethoprim (SXT; 25 µg), doxiciclina (DO; 30 µg), enrofloxacin (ENR; 5 µg), gentamicina (CN; 10 µg), e ossitetraciclina (OT; 30 µg). *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC15442 venivano usati come controllo positivo in ogni test. Gli aloni di inibizione venivano misurati seguendo i documenti CLSI (CLSI, 2014) [7].

RISULTATI

I risultati ottenuti hanno evidenziato la positività a *P. aeruginosa* in 59/755 (7,8%, 95% intervallo di confidenza = 6,05–10,02%) campioni e a *E. coli* in 236/755 (31,3%, 95% CI = 28–34,7%) campioni. Inoltre, sono stati isolati occasionalmente anche alcuni batteri Gram-negativi come *Pantoea* spp., *Serratia* spp, *Morganella* spp., e *Citrobacter* spp. In merito all’antibiogramma, 45/59 (76,3%) ceppi di *P. aeruginosa* sono risultati resistenti a amoxicicillina/acido clavulanico (AMC; 30 µg) e a sulfametossazolo-trimethoprim (SXT; 25 µg), 42/59 (71,2%) alla doxiciclina (DO; 30 µg), 46/59 (78%) alla enrofloxacin (ENR; 5 µg), 17/59 (28,9%) alla gentamicina (CN; 10 µg) e 48/59 (81,3%) all’ossitetraciclina (OT; 30 µg). Tra i ceppi di *E. coli* isolati, 118/231 (51,1%) sono risultati resistenti alla amoxicicillina/acido clavulanico (AMC; 30 µg), 127/231 (55%) a sulfametossazolo-tri-

methoprim (SXT; 25 µg), 132/231 (57,1%) alla doxiciclina (DO; 30 µg), 92/231 (40%) alla enrofloxacin (ENR; 5 µg), 61/231 (26,4%) alla gentamicina (CN; 10 µg), 147/231 (63,6%) all'ossitetraciclina (OT; 30 µg). La maggior parte dei ceppi mostrava fenomeni di multiresistenza. I risultati ottenuti sono sintetizzati in tabella 1 e tabella 2.

Tabella 1. Prevalenza di *P. aeruginosa* e percentuale di AMR nei volatili esaminati.

Volatili esaminati (numero)	Sigla Antibiotici testati Numero di campioni positivi (%)					
	AMC30 ¹	SXT25 ²	DO30 ³	ENR5 ⁴	CN10 ⁵	OT30 ⁶
Fringillidae (388)	38/45 (84,4)	37/45 (82,2)	37/45 (82,2)	40/45 (88,8)	14/45 (31,1)	39/45 (86,6)
Estrildidae (52)	4/5 (80,0)	4/5 (80,3)	1/5 (20,0)	1/5 (20,0)	0/5 (0,0)	4/5 (80,0)
Psittacidae (77)	0/3 (0,0)	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	2/3 (66,7)	2/3 (66,7)	2/3 (66,7)
Columbidae (238)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)

¹Amoxicillina/Acido Clavulanico; ²Trimethoprim/Sulfametossazolo; ³Doxiciclina; ⁴Enrofloxacin; ⁵Gentamicina; ⁶Ossitetraciclina.

Tabella 2. Prevalenza di *E. coli* e percentuale di AMR nei volatili esaminati.

Volatili esaminati (numero)	Sigla Antibiotici testati Numero di campioni positivi (%)					
	AMC30 ¹	SXT25 ²	DO30 ³	ENR5 ⁴	CN10 ⁵	OT30 ⁶
Fringillidae (388)	24/33 (72,7)	13/33 (39,4)	15/33 (45,4)	18/33 (54,5)	12/33 (36,4)	18/33 (54,5)
Estrildidae (52)	5/13 (38,5)	4/13 (30,8)	4/13 (30,8)	4/13 (30,8)	2/13 (15,4)	6/13 (46,1)
Psittacidae (77)	7/8 (87,5)	8/8 (100)	7/8 (87,5)	8/8 (100)	3/8 (37,5)	7/8 (87,5)
Columbidae (238)	82/182 (47,5)	102/182 (61,7)	106/182 (65,4)	62/182 (38,3)	44/182 (25,9)	116/182 (70,4)

¹Amoxicillina/Acido Clavulanico; ²Trimethoprim/Sulfametossazolo; ³Doxiciclina; ⁴Enrofloxacin; ⁵Gentamicina; ⁶Ossitetraciclina.

DISCUSSIONE

In questo studio, *E. coli* e *P. aeruginosa* sono risultati i batteri maggiormente isolati dagli uccelli da compagnia con una prevalenza rispettivamente del 30,7% e del 7,8%. *E. coli* è una delle specie batteriche più patogene negli uccelli da gabbia dove causa aerosacculite, polisierosite, setticemia e altre malattie principalmente extraintestinali [8]. *P. aeruginosa* è, invece, ubiquitario nelle voliere e, in condizioni favorevoli, può agire come patogeno opportunista. Può manifestarsi con infezioni localizzate come riniti, sinusiti e laringiti o può essere associato a setticemia ed enterite emorragica. La AMR dei batteri Gram-negativi è stata ampiamente riportata nella medicina aviaria, specialmente nel pollame; tuttavia, i dati disponibili negli uccelli da compagnia sono molto scarsi. I nostri risultati

sono coerenti con quelli riportati da Sigirci et al. [9] che ha isolato *E. coli* dal 37,7% degli uccelli da compagnia esaminati, con la maggior parte degli isolati resistenti alla tetraciclina (84%) seguita da sulfametossazolo/trimetoprim (46%), streptomina (34%) e kanamicina (25%). I fenotipi multiresistenti si riscontrano frequentemente in *P. aeruginosa* causando infezioni nosocomiali nell'uomo. Questo patogeno opportunisto è considerato "critico" e l'identificazione di nuovi antibiotici è essenziale per superare le sue proprietà di multiresistenza [10]. Per nostra conoscenza, non sono disponibili dati sui profili AMR di questo microrganismo negli uccelli da compagnia, sebbene la possibilità di trasmettere infezioni e geni di resistenza ad altre specie, compreso l'uomo, sia un problema di salute pubblica che dovrebbe richiedere maggiore attenzione. I nostri risultati mostrano che il 7,8% degli uccelli esaminati era positivo a *P. aeruginosa*, con tutti i ceppi resistenti ad almeno un antibiotico, la maggior parte dei quali mostrava multiresistenza con tassi fino al 100%.

Il nostro studio, pur mostrando una caratteristica innovativa per le specie aviarie considerate, presenta alcuni limiti, come una grande differenza nel numero di specie aviarie campionate e una mancanza di caratterizzazione molecolare dei geni di resistenza. Ciononostante, i nostri risultati evidenziano il ruolo degli uccelli da compagnia come potenziali vettori e serbatoi nella diffusione e trasmissione dell'AMR e sottolineano l'importanza dei programmi di sorveglianza per prevenire l'impatto di questa minaccia sulla salute pubblica [11]. Vorremmo anche incoraggiare ulteriori studi più approfonditi in questo campo per caratterizzare i profili plasmidici eventualmente associati ai fenotipi multiresistenti. Infatti, identificare i meccanismi specifici che sono alla base della resistenza antimicrobica, in queste specie, potrebbe fornire ulteriori informazioni sul loro ruolo nell'interfaccia animale-uomo-ecosistema. Sarebbe, infine, auspicabile un approccio One Health con la collaborazione tra medici veterinari, medici, professionisti della sanità pubblica ed epidemiologi al fine di garantire una più efficace e condivisa strategia per la sfida globale all'AMR che attualmente colpisce l'uomo, gli animali e l'ecosistema in modo trasversale.

BIBLIOGRAFIA

1. Founou RC, Founou LL and SY Essack. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 12:e0189621.
2. de Kraker MEA, Stewardson AJ and S Harbarth. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS Med.* 13:e1002184.
3. WHO. (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Available online: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.
4. Dipineto L, Borrelli L, Pace A, Romano V, D'Orazio S, Varriale L, Russo TP and A Fioretti. (2017). *Campylobacter coli* infection in pet birds in southern Italy. *Acta Vet. Scand.* 59:6.
5. Benskin CM, Wilson K, Jones K and IR Hartley. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: A review of the frequency and effects of infection. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 84:349–373.

6. CLSI. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th ed.; Approved Standard M02-A11; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
7. CLSI. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 24th ed.; Approved Standard M100-S24; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
8. Dho-Moulin M and JM, Fairbrother. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299–316.
9. Sigirci BD, Celik B, Halac B, Adiguzel MC, Kekec I, et al. (2020). Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from companion birds. *J. King Saud Univ. Sci.* 32:1069–1073.
10. Pragasam AK, Veeraraghavan B, Nalini E, Anandan S and KS Kaye. (2018). An update on antimicrobial resistance and the role of newer antimicrobial agents for *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J. Med. Microbiol.* 36:303–316.
11. Berendonk TU, Manaia CM, Merlin M, Fatta-Kassinos D, et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:310–317.