

# VALUTAZIONE DEL CONSUMO DI ANTIBIOTICO IN ALLEVAMENTO SUINICOLO E ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN *ESCHERICHIA COLI* INDICATORI FECALI: DATI PRELIMINARI IN TRE ALLEVAMENTI DELL'EMILIA ROMAGNA

## *ANTIBIOTIC USE AND ANTIBIOTIC-RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI FAECAL INDICATORS: PRELIMINARY RESULTS OF THREE FARMS IN EMILIA ROMAGNA (ITALY)*

DE BENE A.F., BOSCO C., DE LUCIA A., MATTEUZZI A., LUPPI A., SCALI F., RUGNA G., BASSI P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia E Dell'Emilia-Romagna  
"Bruno Ubertini", Brescia*

**Parole chiave:** Antibioticoresistenza, Escherichia coli, Suini

**Keywords:** Antibiotic – Resistance, Escherichia Coli, Pigs

### RIASSUNTO

La somministrazione di antibiotico costituisce un fattore di rischio per la selezione e diffusione di batteri antibiotico resistenti. In questo studio si riportano i risultati preliminari di un progetto di Ricerca Corrente (IZSLERPRC2019003), ottenuti valutando il consumo di antibiotico (Treatment Index-TI/100 giorni) e la sensibilità a differenti antibiotici (MIC90 e MBC90) in *E. coli* indicatori fecali prelevati da suinetti sottoscrofa e svezzati in tre aziende della Regione Emilia-Romagna nel 2020. La categoria degli svezzati è risultata quella più ampiamente trattata con antibiotici, le molecole più utilizzate sono state le aminopenicilline. Si riporta l'impiego di *Highest Priority Critically Important Antimicrobials* (HPCIA) in almeno una categoria produttiva per azienda. La via di somministrazione degli antibiotici più utilizzata è risultata quella orale, in particolare per gli svezzati. Il maggior numero di resistenze è stato riscontrato per ampicillina, seguita da tetraciclina, sulfametoxazolo e trimetoprim, sia per gli svezzati che per i sottoscrofa, mentre livelli di resistenza differenti nei tre allevamenti sono stati riscontrati per gentamicina, amikacina e cloramfenicolo. Riguardo agli HPCIA le resistenze più numerose sono state rinvenute per chinoloni e fluoroquinoloni, seguite da quella per i macrolidi. In molti casi l'insorgenza di resistenze per determinate molecole sembra avere correlazione col consumo dell'antibiotico (soprattutto per ampicillina e gentamicina), in altri non sembra esserci correlazione: questo pone l'accento sulla complessità del meccanismo di insorgenza delle resistenze e sui numerosi fattori che collaborano al processo.

### ABSTRACT

The administration of antibiotics is a risk factor for the selection and spread of resistant antibiotic bacteria. This study reports the preliminary results of a Project supported by National Health Ministry (IZSLERPRC2019003), obtained by evaluating the antibiotic use (Treatment Index-TI/100 days) in 2020 of three farms located in Emilia-Romagna (Italy) and the antibiotic resistance (MIC90 and MBC90) in fecal indicator *E. coli* collected from piglets and weaners from the same farms. When examined by pig age class weaner pigs were the most treated with antibiotics compared to piglets, while aminopenicillins were the most molecules used. The use of HPCIA in at least one production category per farm was observed. The most used route of administration of antibiotics was the oral

one, particularly for weaners. A high prevalence of resistance was found for ampicillin, followed by tetracycline, sulfamethoxazole and trimethoprim., for both weaners and piglets, while different resistance levels were found for gentamicin, amikacin and chloramphenicol in all the three farms. Regarding HPCIAAs, most resistance was found to quinolones and fluoroquinolones, followed by macrolides. For some antibiotics (mainly ampicillin and gentamicin) the onset of resistance to certain molecules appears to be correlated to the consumption, this relationship is not clear for other molecules. These preliminary results highlight the complexity of the mechanisms that contribute to the antimicrobial resistance.

## INTRODUZIONE

Il consumo di antibiotico in allevamento suinicolo è prevalentemente concentrato nelle fasi sottoscrofa e post-svezzamento (Bassi *et al.*, 2021), dove si registra solitamente anche il maggior consumo di molecole considerate ad elevata priorità per il consumo umano (HPCIAAs – *Highest Priority Critically Important Antimicrobials*, (WHO, 2018), ovvero cefalosporine di III e IV generazione, chinoloni e fluorochinoloni, polimixine (colistina) e macrolidi.

La somministrazione di antibiotico, soprattutto quando avviene per via orale, oltre a trattare gli agenti patogeni bersaglio, influisce sulla selezione di microrganismi commensali che possiedono meccanismi di resistenza, promuovendone di conseguenza la propagazione. La comparsa di queste resistenze può essere saggiata su microrganismi normalmente isolabili in animali sani e facenti parte della flora commensale (indicatori) tramite determinazione della MIC (Minima Concentrazione Inibente) che, confrontata con criteri interpretativi specifici (Break Point – BP), permette di classificare i batteri testati in Sensibili, Intermedi o Resistenti (Sillely, 2012). I valori di BP maggiormente usati sono stati calcolati per diverse specie batteriche, specifiche molecole antibiotiche e, quando disponibili, per le diverse specie animali, e riportati nelle linee guida stilate dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). L'EUCAST distingue la resistenza clinica, a cui fanno riferimento i break point clinici, dalla resistenza microbiologica, a cui fanno riferimento i valori di cut-off epidemiologici. Questi ultimi, definiti anche ECOFFs, si riferiscono ai ceppi selvaggi o *wild type*, cioè a dei ceppi che non hanno mai mostrato resistenza acquisita nei confronti del farmaco in esame. Oltre alla MIC esiste un altro indice che descrive il comportamento del batterio verso il farmaco, ovvero la Concentrazione Minima Battericida (MBC): questa rappresenta la dose più bassa di farmaco in grado di provocare la morte del 99,9% dei batteri presenti (Poli *et al.*, 2002). Generalmente la MBC tende ad essere più elevata rispetto alla MIC per le molecole ad azione batteriostatica, mentre coincide, o sovrasta di poco, la MIC per le molecole ad attività battericida. All'interno del progetto di Ricerca Corrente “**Relazione tra consumo di antibiotici e antibiotico-resistenza in indicatori fecali nell'allevamento suino**” (IZSLERPRC2019003), finanziato dal Ministero della Salute, che ha come obiettivo quello di indagare la relazione tra il consumo di antibiotici e l'andamento dei profili di resistenza in *E. coli* indicatori isolati in 10 allevamenti suinicoli, si riportano i risultati preliminari ottenuti valutando i consumi di antibiotico (2020) e le resistenze espresse in *E. coli* indicatori prelevati da suinetti sottoscrofa e suinetti svezzati in tre aziende dell'Emilia Romagna.

## MATERIALI E METODI

### Consumo di antibiotico

Sono stati raccolti i dati relativi al consumo di antibiotici per l'anno 2020 attraverso la consultazione delle ricette elettroniche (REV), il consumo dell'antibiotico è stato poi

rapportato alla categoria produttiva a cui è stato somministrato secondo le indicazioni degli allevatori e dei veterinari aziendali. La DDDAit di un farmaco veterinario rappresenta la quantità di principio attivo, in milligrammi, somministrata per kg di peso vivo al giorno (mg/kg/d). Le DDDAit sono state stabilite per ciascun principio attivo con attività antimicrobica, contenuto nei farmaci veterinari registrati per il suino in Italia, in modo distinto per ogni via di somministrazione (orale, premiscela, parenterale). Ciascuna DDDAit è stata ricavata calcolando la media aritmetica del dosaggio giornaliero previsto per ogni farmaco e definito nel corrispondente riassunto delle caratteristiche del prodotto (RCP). Le DDDAit dei principi attivi *long acting* sono state ottenute rapportando la dose al numero di giorni corrispondenti all'effetto terapeutico. Infine, sono state assegnate DDDAit specifiche alle associazioni di principi attivi solo nel caso in cui queste fossero legate a un effetto di sinergismo che comportasse una sostanziale riduzione del dosaggio di almeno uno dei due principi attivi associati rispetto a quello dello stesso principio attivo somministrato singolarmente, come previsto dai principi sull'assegnazione delle DDDvet (EMA, 2015). È stato, quindi, calcolato il consumo utilizzando la seguente formula ricavando l'«Incidenza del Trattamento» (Treatment Index – TI) per 100 giorni di produzione per ogni categoria produttiva (scrofe, suinetti sottoscrofa, suinetti svezzati, ingrassi):

$$(((mg_{pa}) / (DDDAit_{pa} * pesovivo_{kg} * n_{animali\ a\ rischio}))) / (gg\ a\ rischio_{trattamento})) * 100$$

Ad ogni categoria sono stati assegnati i seguenti pesi standard al trattamento: 240 kg per le scrofe, 4 kg per i suinetti sottoscrofa, 12 kg per i suinetti svezzati e 100 kg per gli ingrassi. Il TI100 è una misura standard di calcolo del consumo di antibiotico, che può essere interpretata in tre diversi modi:

- 1-la percentuale di volte in cui un animale è stato sottoposto ad un trattamento durante il suo ciclo produttivo;
- 2-il numero di giorni in trattamento per 100 giorni di produzione;
- 3-il numero di animali trattati per 100 animali presenti nell'allevamento in un dato giorno (AACTING, 2019).

### **Isolamento di *E. coli* e test di sensibilità**

Per ogni allevamento sono stati eseguiti 21 tamponi rettali da suinetti sottoscrofa e 21 da suinetti svezzati privi di sintomatologia gastroenterica. I tamponi rettali sono stati seminati su MacConkey Agar (MAC), selettivo e differenziale per enterobatteri e incubati a 37±2°C in aerobiosi. Colonie tipiche lattosio + sono state isolate su Agar-Sangue (ASA), per identificare il fenotipo emolitico.

Per la determinazione delle MIC tramite piastre commerciali Thermofisher Sensititre™ EUVSEC3 sono state allestite sospensioni e brodi secondo le indicazioni della ditta fornitrice. La sensibilità degli isolati di *E. coli* è stata testata per le molecole elencate in Tabella 1 e utilizzate in ambito europeo per il monitoraggio delle resistenze in batteri zoonotici e commensali isolati da matrici animali all'interno della catena alimentare (suini, bovini, pollame) (Decisione di esecuzione della Commissione Europea (UE) 2020/1729) e interpretati secondo i BP indicati da EFSA (2019).

Dalle MIC ricavate sono state calcolate per ogni molecola la MIC50 (ovvero la concentrazione di antibiotico al di sotto della quale si trovano il 50% dei ceppi isolati) e la MIC90 (ovvero la concentrazione di antibiotico al di sotto della quale si trovano il 90% dei ceppi isolati) per ogni categoria produttiva di ogni singolo allevamento.

| Antibiotico            | Diluizioni testate (mg/L)                      | BP clinico | ECOFFs |
|------------------------|--|------------|--------|
| Ampicillina (AMP)      | 1; 2; 4; 8; 16; 32                             | >8         | >8     |
| Azitromicina (AZI)     | 2; 4; 8; 16; 32; 64                            | ND*        | >16    |
| Amikacina (AMI)        | 4; 8; 16; 32; 64; 128                          | >16        | >8     |
| Gentamicina (GEN)      | 0.5; 1; 2; 4; 8; 16                            | >4         | >2     |
| Tigeciclina (TGC)      | 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8                          | >2         | >1     |
| Ceftazidime (TAZ)      | 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8                          | >4         | >0,5   |
| Cefotaxime (FOT)       | 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8                          | >2         | >0,25  |
| Colistina (COL)        | 1; 2; 4; 8; 16                                 | >2         | >2     |
| Acido nalidixico (NAL) | 4; 8; 16; 32; 64                               | ND         | >16    |
| Tetraciclina (TET)     | 2; 4; 8; 16; 32                                | ND         | >8     |
| Trimetoprim (TMP)      | 2; 4; 8; 16; 32; 64                            | >4         | >2     |
| Sulfametoxazolo (SMX)  | 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512                   | ND         | >64    |
| Cloramfenicolo*(CHL)   | 8; 16; 32; 64                                  | >8         | >16    |
| Meropenem (MERO)       | 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16   | >0,125     | >8     |
| Ciprofloxacina (CIP)   | 0,015; 0,03; 0,06 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 | >0,5       | >0,06  |

**Tabella 1:** Riepilogo delle molecole antibiotiche testate, loro diluizioni BP clinici e ECOFF per la determinazione delle resistenze dei ceppi (EFSA, 2019)\*ND: non disponibile.

**Table 1:** Summary of tested antibiotic molecules, their clinical BP dilutions and ECOFF for the determination of strain resistances (EFSA, 2019)\*ND: not available.

Per alcune molecole (AMP, AZI, AMI, GEN, COL, NAL, TET, TMP, SMX, CHL e CIP), quando possibile, è stata determinata anche la MBC seminando, per ogni pozzetto privo di crescita, 20µl di brodo su piastra con terreno non selettivo Plate Count Agar (PCA). Dopo incubazione delle piastre a 35°C per 24h, sono state registrate le crescite relative alle diverse diluizioni per ogni molecola. Dalle MBC ricavate, sono state calcolate la MBC50 e la MBC90 di ogni antibiotico per ogni categoria produttiva di ciascun allevamento.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Allevamenti testati e consumo di antibiotico:

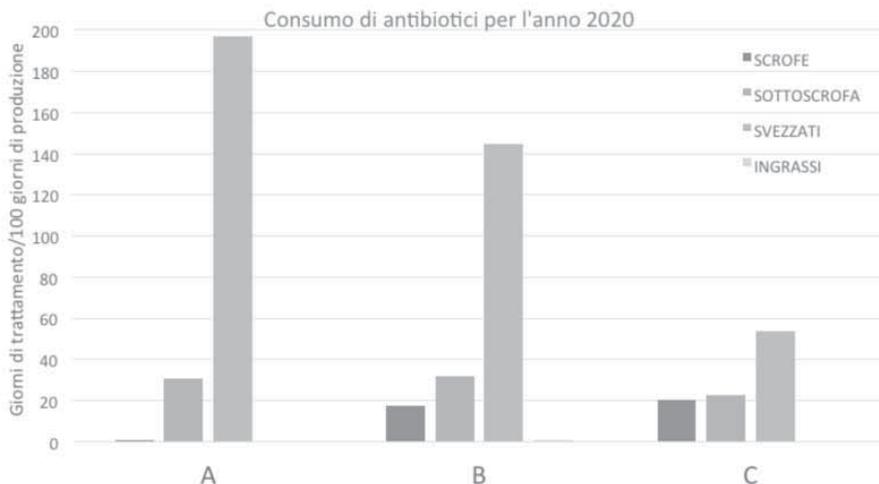
I tre allevamenti testati (A, B, C) risultano così composti:

- A: allevamento con settore di riproduzione e post-svezzamento, consistenza media di 150 scrofe;
- B: allevamento a ciclo chiuso composto da riproduzione, post-svezzamento e ingrasso, consistenza media di 150 scrofe;

- C: allevamento con settore di riproduzione e post-svezzamento, consistenza media di 220 scrofe.

In Figura 1 è riportato il dato di consumo dell'antibiotico nell'anno 2020 (TI), declinato come numero di giorni di trattamento per 100 giorni di produzione.

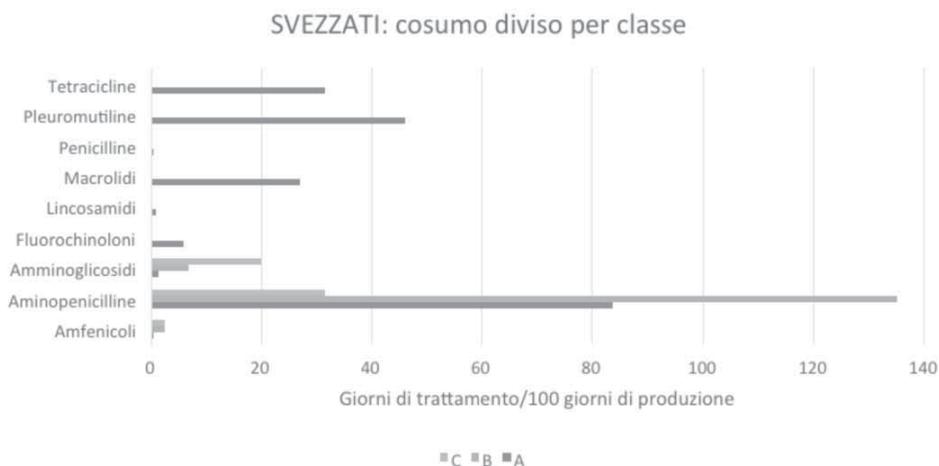
Tra le categorie produttive allevate, quella più trattata con antibiotici è stata sicuramente quella degli svezzati, in particolare il consumo di farmaco si è attestato su livelli alti nell'allevamento A (TI=197) e medio-alto nell'allevamento B (TI=144), mentre nell'allevamento C si è fermato su valori medio-bassi (TI=54). Nei suinetti sottoscrofa il consumo di antibiotico complessivo è risultato simile per i tre allevamenti (rispettivamente TI= 30,8, 31,6; 22,5), ma si registra un consumo inferiore nelle scrofe nell'azienda A (TI<1) rispetto a B (TI=17,5) e C(TI=20,1).



**Figura 1:** Consumo totale di antibiotico per l'anno 2020 suddiviso per azienda e categorie produttive.

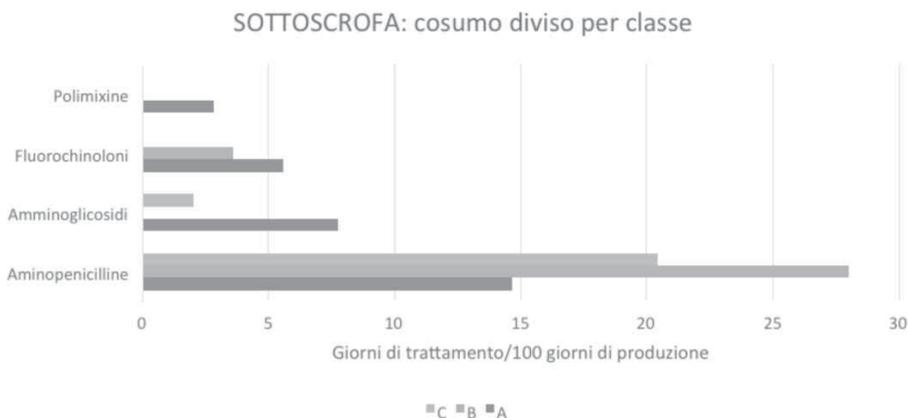
**Figure 1:** Total antibiotic consumption (2020) divided by farm for sows, piglets, weaners and fatteners.

Considerando i consumi delle diverse classi di antibiotico, le molecole più utilizzate in tutte e tre le aziende sono state le aminopenicilline sia nei suinetti svezzati (Figura 2), sia nei suinetti sottoscrofa (Figura 3) ( $TI_B=135$ ,  $TI_C=83$ ,  $TI_A=32$ ). L'allevamento A, tra le tre aziende, è stato l'unico ad utilizzare negli svezzati le pleuromutiline ( $TI=46$ ), le tetracicline ( $TI=32$ ) e i macrolidi ( $TI=27$ ), ed in misura minore fluorochinoloni ( $TI=6$ ), lincosamidi ( $TI=1$ ) e penicilline ( $TI<1$ ). Altre molecole utilizzate da tutti e 3 gli allevamenti sono state gli amfenicoli e gli aminoglicosidi (in particolare l'azienda C con  $TI=20$  ed in misura minore l'azienda B con  $TI=7$  e l'azienda A con  $TI=1$ ).



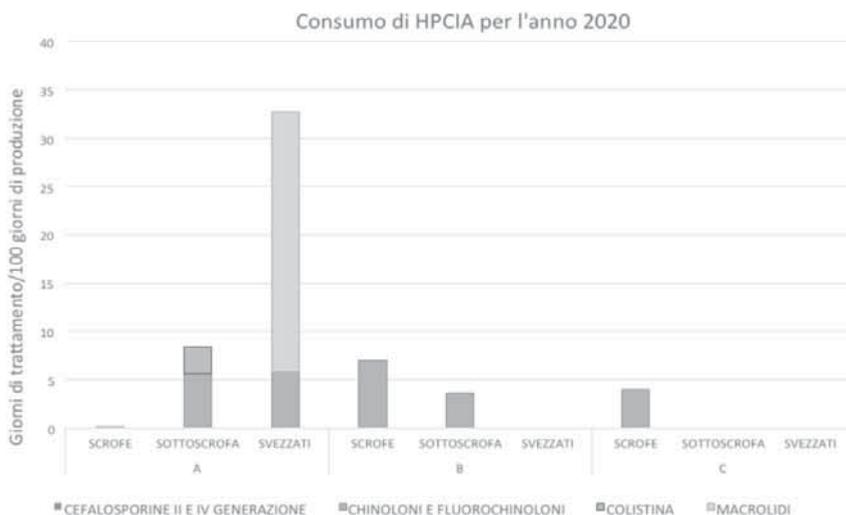
**Figura 2:** Consumo di antibiotico suddiviso per molecole ed azienda nella categoria degli svezzati.

**Figure 2:** Antibiotic consumption divided by molecule and farm in weaners.

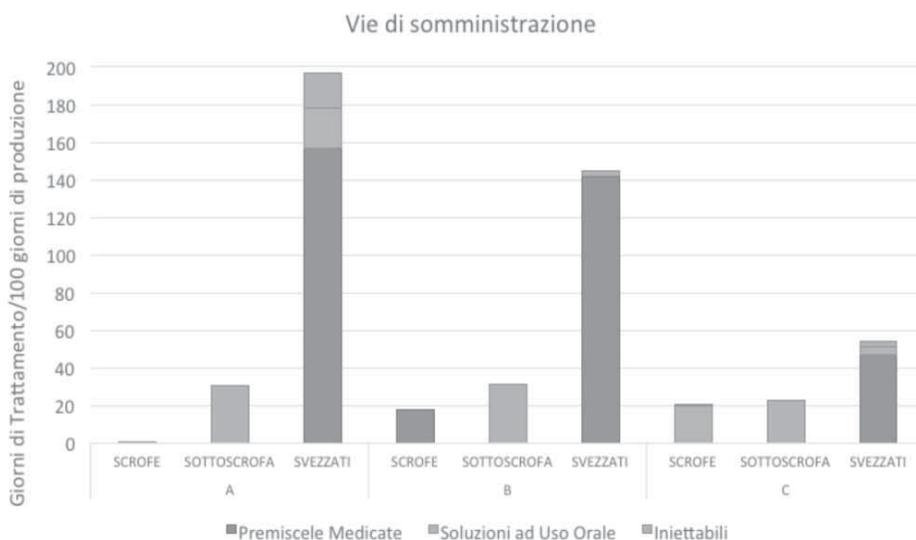


**Figura 3:** Consumo di antibiotico suddiviso per molecole ed azienda nella categoria dei sottoscrofa.  
**Figure 3:** Consumption of antibiotic divided by molecule and farm in piglets.

Nei suinetti sottoscrofa (Figura 3) le molecole più utilizzate in tutte e tre le aziende sono risultate le aminopenicilline, seppur con consumi molto ridotto rispetto agli svezzati ( $TI_B=28$ ,  $TI_C=20$ ,  $TI_A=15$ ). L'allevamento A, inoltre, ha consumato fluorochinoloni insieme all'allevamento B ( $TI_A=6$  e  $TI_B=4$ ), aminoglicosidi insieme all'allevamento C ( $TI_A=8$  e  $TI_C=2$ ) e polimixine ( $TI=3$ ). Il consumo di HPCIA nei tre allevamenti per ognuna delle categorie produttive viene riportato in Figura 4. L'azienda A è l'unica ad utilizzare HPCIA nella categoria degli svezzati. Chinoloni e Fluorochinoloni risultano essere le molecole di importanza critica maggiormente utilizzate in tutti e 3 gli allevamenti ed in tutte le categorie produttive, in particolare: per i sottoscrofa sono usati nell'azienda A ( $TI=6$ ) e nell'azienda B ( $TI=4$ ), mentre risultano consumati per le scrofe nell'azienda B ( $TI=7$ ) e nell'azienda C ( $TI=4$ ). L'allevamento A è stato l'unico a fare ricorso anche alla Colistina ( $TI=3$ ), in particolare nei sottoscrofa. Non sono riportati consumi di cefalosporine di III e IV generazione.



**Figura 4:** Consumo di HPCIA suddiviso per molecola, azienda e categoria produttiva.  
**Figure 4:** HPCIA consumption divided by molecule and farm for sows, piglets and weaners.



**Figura 5:** Vie di somministrazione di antibiotico suddivise per azienda e categoria produttiva.

**Figure 5:** Route of antibiotic administration by farm for sows, piglets and weaners.

Infine, riguardo le vie di somministrazione dell'antibiotico, risulta evidente come per tutte le tre aziende la via orale tramite la somministrazione di premiscele medicate sia quella prevalente nella categoria degli svezzati, al contrario nei suinetti sottoscrofa l'antibiotico è stato somministrato esclusivamente per via iniettiva. Nelle scrofe, invece, si manifestano tre differenti situazioni, l'azienda A ha utilizzato maggiormente la via iniettiva, la B la via orale tramite premiscele e la C la via orale tramite soluzioni da sciogliere in acqua (Figura 5).

### Sensibilità agli antibiotici

Complessivamente sono stati isolati e testati in broddiluzione:

- A: 21 *E. coli* (0 emolitici) da sottoscrofa; 20 *E. coli* (2 emolitici) da suinetti svezzati
- B: 21 *E. coli* (3 emolitici) da sottoscrofa; 21 *E. coli* (6 emolitici) da suinetti svezzati
- C: 21 *E. coli* (1 emolitico) da sottoscrofa; 18 *E. coli* (2 emolitici) da suinetti svezzati

Le MIC 90 e le MBC 90 calcolate per ciascuna molecola testata sono riportate rispettivamente in Tabella 2 e Tabella 3.

Il maggior consumo di antibiotico si è verificato nella categoria degli svezzati per tutte le aziende, tramite l'utilizzo di premiscele medicate. Rispetto agli svezzati, il consumo di antibiotico cala sensibilmente nelle categorie dei sottoscrofa, dove viene preferita la via iniettiva, e nelle scrofe, dove la via di somministrazione è risultata eterogenea.

L'ampio ricorso ad una specifica classe di molecole, le aminopenicilline, è risultato analogo all'interno delle tre aziende in tutte le categorie produttive, ad eccezione delle scrofe presenti nelle aziende A e B. L'elevato ricorso alle aminopenicilline può essere la causa dei valori elevati di MIC50 e MIC90 registrati per questa molecola sia nei suinetti sottoscrofa, sia negli svezzati (Tabella 3), con valori ben oltre il BP clinico (>8). La resistenza alle

aminopenicilline degli *E. coli* è stata riportata anche dallo studio di Bosco *et al.* (2021), condotto su *E. coli* isolati da matrici patologiche di suino in 4 anni (2017-2021) nelle sedi IZSLER dell'Emilia-Romagna, in cui si è osservata resistenza ad AMP nel 95,9% dei ceppi isolati. In contesto europeo, su *E. coli* commensali isolati da campioni fecali e carni fresche di suini da ingrasso, sono stati registrati livelli variabili di resistenza ad AMP, con una media del 32%, in ceppi di *E. coli* isolati in 31 Paesi (28 UE e 3 extra UE), in particolare i livelli più alti di resistenze sono stati rilevati in Spagna (77,1%) e Italia (70,6%), mentre quelli più bassi in Norvegia (6,9%) e Finlandia (8,6%) (EFSA, 2020). In quest'ultima pubblicazione, però, gli isolati provenivano esclusivamente da ingrassi, dove i consumi di antibiotico sono generalmente molto ridotti rispetto alle categorie produttive prese in considerazione nel presente progetto.

Dopo l'AMP, tra molecole testate verso le quali si sono registrate maggiori resistenze, compaiono la TET, il SMX e il TMP, per le quali le MIC<sub>90</sub> e le MBC<sub>90</sub> (Tabelle 3 e 4) hanno superato la massima diluizione testata all'interno del panel in tutte e tre le aziende sia negli svezzati che per i sottoscrofa, con livelli ben oltre i BP clinici o gli ECOFFs. A differenza delle aminopenicilline, però, analizzando i dati sulle resistenze con i dati sui consumi delle singole molecole, non sembra che via sia un nesso di causalità; infatti, è stato registrato solo utilizzo di TMP per gli svezzati dell'allevamento A. Anche Bosco *et al.* (2021) ha evidenziato alti livelli di resistenza medi nel quadriennio 2017-2021 per TET (89,7%) e SMX (74,8%). Nel report EFSA (2020) sono stati riportati livelli di resistenza in *E. coli* a TET, TMP e SMX considerevoli, con intervalli ampi a seconda dello Stato considerato, inoltre, si è osservata una MDR (*Multi Drug Resistance*) per AMP, TET, TMP, SMX nel 48,5% degli isolati di *E. coli*. Queste resistenze risultano di fatto in linea con i rapporti EMA (2020) sulla vendita dei prodotti antibiotici ad uso veterinario in Europa dal 2011 al 2018, nei quali appare evidente come i principi attivi maggiormente utilizzati in medicina veterinaria appartengano alle classi di tetracicline, penicilline e sulfamidici (Bosco *et al.*, 2021). L'acquisizione di resistenze da parte dei batteri, però, non è sempre limitata al solo meccanismo d'azione della molecola antibiotica utilizzata, si parla infatti di "resistenza pleiotropica" quando un singolo evento genetico, come una mutazione o acquisizione di geni di resistenza, produce effetti su diverse classi antimicrobiche (Cantón *et al.*, 2011). Un esempio è la mutazione che provoca una *up-regulation* delle pompe di efflusso di *Pseudomonas aeruginosa*, a cui consegue contemporaneamente resistenza nei confronti di composti beta-lattamici, fluorochinoloni e aminoglicosidi. Inoltre, non sempre l'acquisizione di geni di resistenza ha ripercussioni negative sulla *fitness* del battere, può succedere quindi che, una volta acquisiti geni di resistenza, questi permangano nella popolazione batterica anche in assenza di selezione esercitata dall'antibiotico (Cantón *et al.*, 2011), diventa interessante, quindi, valutare anche lo storico dei consumi di antibiotico dell'allevamento.

|            | AMP |     | AZI |     | AMI |     | GEN |     | TGC |     | TAZ |     | FOT  |      | COL |     | NAL |     | TET |     | TMP |     | SMX |     | CHL   |       | MERO |     | CIP |     |       |       |    |       |      |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|------|-----|-----|-----|-------|-------|----|-------|------|
|            | MBC | MIC | MBC  | MIC  | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC   | MIC   | MBC  | MIC | MBC | MIC |       |       |    |       |      |
|            | TOT | 50  | TOT  | 50   | TOT | 50  | TOT | 50  | TOT | 50  | TOT | 50  | TOT | 50  | TOT   | 50    | TOT  | 50  | TOT | 50  |       |       |    |       |      |
| A sottosc  | >32 | >32 | 21  | 8   | 64  | 21  | 4   | 4   | 21  | >16 | >16 | 21  | 0,25 | 0,25 | 21  | 1   | 1   | 21  | >64 | >64 | 21  | >16 | >16 | 21  | >512  | >512  | 21   | >64 | >64 | 21  | >0,03 | >0,03 | 21 | 8     | >8   |
| A svezzati | >32 | >32 | 20  | 4   | 8   | 20  | 4   | 4   | 20  | 0,5 | 8   | 20  | 0,25 | 0,25 | 20  | 1   | 1   | 20  | 4   | 8   | 20  | >32 | >32 | 20  | >0,25 | >0,16 | 20   | 8   | >64 | 20  | 0,03  | 0,03  | 20 | 0,015 | 0,25 |
| B sottosc  | >32 | >32 | 21  | 4   | 64  | 21  | 4   | 4   | 20  | 0,5 | 0,5 | 21  | 0,25 | 0,25 | 21  | 1   | 1   | 21  | 4   | >64 | 21  | >16 | >16 | 21  | >512  | >512  | 21   | 8   | 16  | 21  | 0,03  | 0,03  | 21 | 0,015 | 0,5  |
| B svezzati | >32 | >32 | 21  | 4   | 8   | 21  | 4   | 4   | 21  | 8   | >16 | 21  | 0,25 | 0,25 | 21  | 1   | 1   | 21  | 8   | >64 | 21  | >16 | >16 | 21  | >512  | >512  | 21   | >64 | >64 | 21  | 0,03  | 0,03  | 21 | 0,06  | 0,25 |
| C sottosc  | >32 | >32 | 21  | 4   | 8   | 21  | 4   | 4   | 21  | 0,5 | 16  | 21  | 0,25 | 0,25 | 21  | 1   | 1   | 21  | 4   | >64 | 21  | >16 | >16 | 21  | 32    | >512  | 21   | 8   | >64 | 21  | 0,03  | 0,03  | 21 | 0,015 | 1    |
| C svezzati | >32 | >32 | 18  | 8   | 32  | 18  | 4   | 4   | 18  | >16 | >16 | 18  | 0,25 | 0,50 | 18  | 1   | 1   | 18  | 4   | >64 | 18  | >16 | >16 | 18  | >512  | >512  | 18   | >64 | >64 | 18  | 0,03  | 0,03  | 18 | 0,015 | 2    |

**Tabella 2:** MIC50 e MIC90 dei ceppi isolati suddivisi per allevamento, categoria produttiva ed antibiotico.

**Table 2:** MIC50 and MIC90 of the isolated strains divided by farm and antibiotic for piglets and weaners.

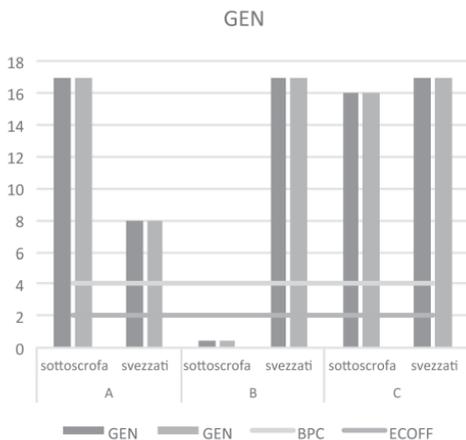
|            | AMP |     | AZI |     | AMI |     | GEN |     | NAL |     | TET |     | TMP |     | SMX |     | CHL |     | CIP |     |    |      |      |    |     |     |    |       |     |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|------|------|----|-----|-----|----|-------|-----|
|            | MBC | MIC |    |      |      |    |     |     |    |       |     |
|            | TOT | 50  |    |      |      |    |     |     |    |       |     |
| A sottosc  | >32 | >32 | 20  | 32  | 64  | 21  | 4   | 16  | 20  | >16 | >16 | 21  | >64 | >64 | 21  | >32 | >32 | 20  | >16 | >16 | 19 | >512 | >512 | 19 | >64 | >64 | 19 | >8    | >8  |
| A svezzati | >32 | >32 | 19  | 8   | 8   | 20  | 4   | 4   | 19  | 0,5 | 8   | 19  | 4   | 32  | 20  | >32 | >32 | 20  | 2   | >16 | 20 | >512 | >512 | 20 | >32 | >64 | 17 | 0,015 | >8  |
| B sottosc  | >32 | >32 | 20  | 8   | 64  | 20  | 4   | 4   | 21  | 0,5 | 0,5 | 20  | 4   | >64 | 20  | >8  | >32 | 21  | >16 | >16 | 21 | >512 | >512 | 20 | >32 | >64 | 19 | 0,03  | 0,5 |
| B svezzati | >32 | >32 | 19  | 8   | >16 | 20  | 4   | >16 | 21  | 8   | >16 | 20  | 8   | >64 | 21  | >32 | >32 | 21  | >16 | >16 | 21 | >512 | >512 | 21 | >64 | >64 | 17 | 0,06  | 0,5 |
| C sottosc  | >32 | >32 | 20  | 4   | >32 | 21  | 4   | 4   | 21  | 0,5 | 16  | 20  | 4   | >64 | 21  | >32 | >32 | 19  | >16 | >16 | 19 | >64  | >512 | 21 | 32  | >64 | 21 | 0,03  | >2  |
| C svezzati | >32 | >32 | 15  | 8   | 64  | 18  | 4   | 4   | 16  | >16 | >16 | 16  | 4   | >64 | 17  | >32 | >32 | 18  | >16 | >16 | 18 | >512 | >512 | 17 | >64 | >64 | 16 | 0,03  | 2   |

**Tabella 3:** MBC50 e MBC90 dei ceppi isolati suddivisi per allevamento, categoria produttiva ed antibiotico.

**Table 3:** MBC50 and MBC90 of the isolated strains divided by farm and antibiotic for piglets and weaners.

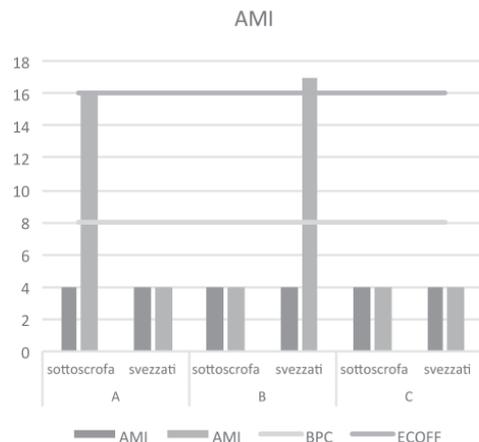
Interessante è quanto emerso per la gentamicina (GEN): questa molecola, appartenente alla classe degli aminoglicosidi, è stata utilizzata nei sottoscrofa degli allevamenti A e C e negli svezzati degli allevamenti B e C (Figura 2, Figura 3). Similmente, i valori di MIC90 e MBC90 sono risultati molto elevati nelle stesse categorie (Figura 6). Nello studio di Bosco *et al.* (2021) erano state individuate resistenze a GEN in *E. coli* da matrici patologiche fino a percentuali massime del 63,3%. Dal report EFSA sono stati ottenuti livelli di resistenza alla GEN da bassi a molti bassi (media europea 2,7%), benché singoli Stati abbiano riscontrato valori più elevati della media, in particolare Italia e Grecia (9,4%) (EFSA,2020).

Per un altro aminoglicoside testato (AMI), i valori ottenuti hanno mostrato MIC90 tutte inferiori al BP clinico (>16) in tutte le aziende per tutte le categorie produttive, ma nei sottoscrofa dell'allevamento A e negli svezzati dell'allevamento B la MBC90 è risultata maggiore (rispettivamente 16 e >16) (Figura 7), contrariamente a ciò che ci si dovrebbe attendere per le molecole che svolgono un meccanismo d'azione battericida in cui MIC e MCB dovrebbero coincidere (Nameth *et al.*, 2014). Nell'allevamento A il consumo di aminoglicosidi nei sottoscrofa è piuttosto elevato, quindi, questo dato è in linea con quanto osservato, nell'allevamento B, invece, il consumo negli svezzati non si trova tra i più elevati, ma non abbiamo informazioni in merito ai consumi relativi agli anni precedenti il 2020.



**Figura 6:** Valori di MIC90 e MBC90 per GEN in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.

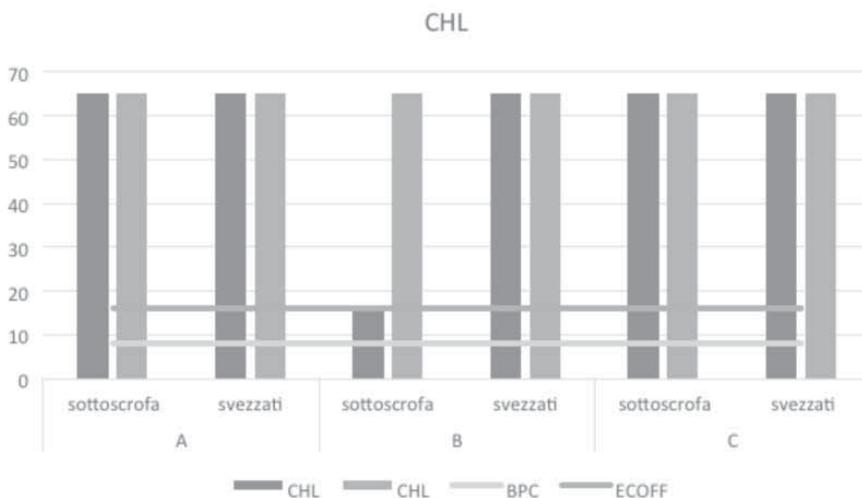
**Figure 6:** MIC90 and MBC90 for GEN in indicator *E. coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.



**Figura 7:** Valori di MIC90 e MBC90 per AMI in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.

**Figure 7:** MIC90 and MBC90 for AMI in indicator *E. coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

Riguardo al CHL, appartenente alla classe dei fenicoli, le MIC90 sono risultate tutte oltre l'ultima diluizione testata (>64) in sottoscrofa e svezzati di tutte e tre le aziende, ad eccezione dei sottoscrofa dell'azienda B (MIC90=16), con MIC 90 inferiore ma comunque oltre il BP clinico (>8) (Figura 8). A livello europeo le resistenze di *E. coli* isolati dal suino a CHL sono risultate a livelli medi o moderati (12% dei ceppi analizzati resistenti), benché alcune nazioni abbiano fatto registrare livelli maggiori (Italia 47,6%, Portogallo 44,4%, Grecia 40,6%, Cipro 54,4%) (EFSA,2020). Ricordiamo che il Cloramfenicolo (CHL) è vietato negli animali produttori di derrate alimentari dal 1994, tuttavia viene utilizzato come molecola prototipo rilevatore di resistenze per il Tiamfenicolo e in parte per il Florfenicolo (FFC), il cui uso è ammesso per questa categoria di animali (Poirel *et al.* 2018). In un microrganismo la resistenza al FFC si estende anche al CHL, mentre altri meccanismi di resistenza al CHL non estendono la resistenza verso il FFC (<https://www.izslt.it/crab/pillole-per-il-veterinario-pratico/>).

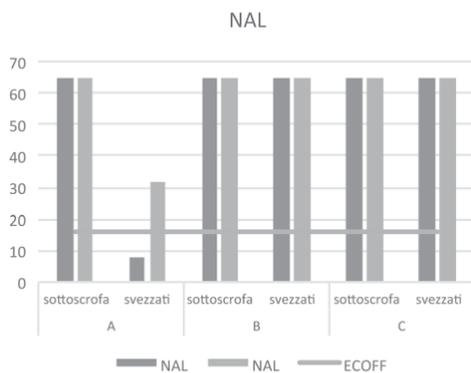


**Figura 8:** Valori di MIC90 e MBC90 per CHL in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.

**Figure 8:** MIC90 and MBC90 for CHL in indicator *E.coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

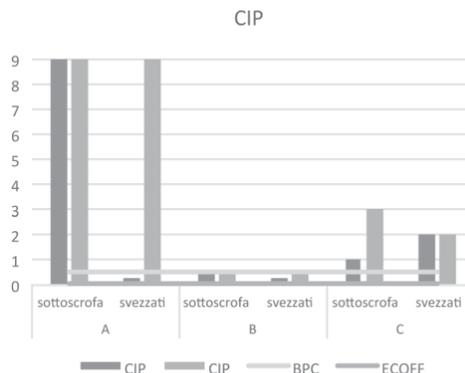
### Sensibilità ai HPCIA s

Per quanto riguarda chinoloni (NAL) e fluorochinoloni (CIP): le MIC90 e le MBC90 per NAL sono risultate tutte oltre il limite dell'ultima diluizione (>64) nei tre allevamenti nelle diverse categorie produttive, tranne per gli svezzati dell'azienda A (Figura 9); le MIC90 per CIP sono risultate oltre il BP clinico (>0,5) nei sottoscrofa e negli svezzati dell'allevamento C e oltre l'ultima diluizione disponibile nei sottoscrofa di A (Figura 10).



**Figura 9:** Valori di MIC90 e MBC90 per CHL in *E. coli* indicatori rapportati all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.

**Figure 9:** MIC90 and MBC90 for NAL in indicator *E.coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.



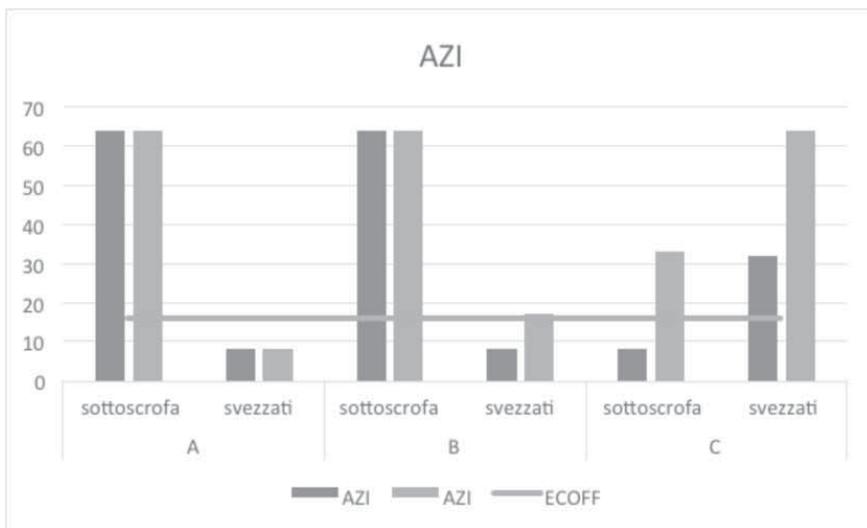
**Figura 10:** Valori di MIC90 e MBC90 per CIP in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.

**Figure 10:** MIC90 and MBC90 for CIP in indicator *E.coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

Come si evince dalla Figura 4, il consumo di chinoloni e fluorochinoloni si è registrato in sottoscrofa e svezzati dell'azienda A, nelle scrofe dell'allevamento B e C e nei sottoscrofa dell'allevamento B. In particolare, l'azienda A ha avuto consumi di fluorochinoloni (CIP) da moderati ad elevati in tutti e tre gli indirizzi produttivi, infatti nonostante calino sia il consumo sia la MIC90 negli svezzati rispetto ai sottoscrofa, la MBC90 negli svezzati rimane elevata al pari della MBC90 nei sottoscrofa, riflesso di una possibile perdita di efficacia della molecola per raggiungere la concentrazione battericida. I valori MIC90 e MBC90 per NAL (chinoloni) in B e C risultano elevati e, nonostante non vi sia stato consumo di chinoloni in sottoscrofa e svezzati, si è registrato un consumo elevato nelle scrofe. Si noti anche che i consumi di fluorochinoloni siano, tra le tre aziende, più bassi nell'allevamento C, quindi è probabile che i valori MIC90 e MBC90 oltre i *break point* in questo allevamento possano essere ascrivibili a resistenze pleiotropiche o resistenze selezionate dall'uso di queste classi di molecole negli anni passati, oppure influenzati dai consumi registrati nelle scrofe (Figura 4). Contrariamente ai dati registrati in questi allevamenti, la percentuale media di *E. coli* resistenti alla CIP è risultata leggermente più elevata (7,4%) rispetto al NAL (6,2%) considerando il contesto europeo dei suini da ingrasso (EFSA, 2020).

L'unico allevamento che ha fatto ricorso alla classe dei macrolidi è stato A per gli svezzati, dove però la MIC90 e la MBC90 sono risultate le più basse (8), e al di sotto del ECOFF (>16) (Figura 13). Le MIC90 sono risultate oltre gli ECOFFs negli svezzati di C (32) ed oltre l'ultima diluizione disponibile (>64) nei sottoscrofa di A e B. L'AZI, come gli altri macrolidi, è considerato un antibiotico batteriostatico, tuttavia ad alte dosi il suo meccanismo d'azione diviene battericida (HUMANITAS, 2021); per questo motivo, il fatto che la dose battericida sui ceppi commensali esaminati, in particolare negli svezzati dell'azienda B ed in entrambe le

categorie di C, risultati più elevata rispetto alla dose batteriostatica ( $MBC_{90} > MIC_{90}$ ) appare in linea con le caratteristiche del farmaco. L'azienda B, come descritto in Figura 4, è stata l'unica ad utilizzare lincosamidi nelle scrofe: quest'evento potrebbe aver favorito l'insorgenza di resistenze ad AZI nei sottoscrofa di B, vista l'affinità del meccanismo d'azione sulla subunità 50s ribosomiale tra lincosamidi e macrolidi ed il similare meccanismo di resistenza adottato dai batteri verso entrambe le molecole (Docquier, 2012). I valori di  $MIC_{90}$  dell'AZI oltre l'ECOFF nei sottoscrofa di A e negli svezzati di C, invece, non trovano un nesso causale nei consumi stimati in questi indirizzi produttivi, quindi è possibile che siano l'effetto di un consumo antecedente al 2020 o di resistenze pleiotropiche. A livello europeo le resistenze all'AZI registrate in *E. coli* indicatori isolati da suini sono risultate rare o comunque a livelli bassi o molto bassi (media europea 1,5%) (EFSA, 2020).



**Figura 11:** Valori di  $MIC_{90}$  e  $MBC_{90}$  per AZI in *E. coli* indicatori all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.

**Figure 11:**  $MIC_{90}$  and  $MBC_{90}$  for AZI in indicator *E. coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

Per quanto riguarda le altre classi di HPCIA, cefalosporine di III e IV generazione (FOT, TAZ) e polimixine (COL), non sono state registrate  $MIC_{90}$  superiori ai BP clinici, benché l'allevamento A abbia fatto uso di COL nei sottoscrofa. Nello studio di Bassi *et al.* (2021) è stato riportato un calo del consumo di COL nei sottoscrofa del 98,7% nel triennio 2016-2018, imputabile prevalentemente alla revoca all'autorizzazione all'immissione in commercio di prodotti contenenti associazioni con colistina da somministrare per via orale (Decisione di Esecuzione della Commissione del 14.7.2016), mentre è risultato nullo nelle scrofe e negli svezzati, in un campione di allevamenti in Emilia-Romagna. A livello europeo le resistenze riscontrate in queste classi di molecole sono state rare o molto basse (EFSA, 2020). Non si sono registrate resistenze ai carbapenemi (MERO) negli isolati testati.

## CONCLUSIONI

Dai risultati preliminari ottenuti, è emerso che l'elevato grado di resistenze riscontrate per aminopenicilline è in accordo con i consumi di queste molecole nell'allevamento, così come sembra esserci un discreto grado di concordanza tra consumi e resistenze per Gentamicina;

invece, altre molecole quali SMX, TET, TMP, CHL hanno registrato MIC90 e MBC90 elevate, pur non registrando un consumo sempre elevato della molecola nelle stesse categorie produttive. Sono state individuate, inoltre, resistenze, anche multiple, ad alcuni HPCIAAs delle classi di chinoloni, fluorochinoloni e macrolidi. Questi dati, seppur preliminari, inducono a porre l'attenzione a meccanismi di multi-resistenza come la cross-resistenza o resistenza pleiotropica, attraverso i quali si selezionano resistenze anche differenti rispetto alle molecole di più diffuso utilizzo, grazie alla complessità dei meccanismi che si insinuano nel processo di selezione, rendendo ancora più importante l'attività di riduzione complessiva e ottimizzazione del consumo di antibiotico. Come previsto dal progetto, l'andamento dei consumi e delle resistenze sarà monitorato nel tempo e ulteriori indagini di tipo molecolare permetteranno di indagare i genotipi di resistenza riscontrati e l'eventuale significato in relazione ai consumi di antibiotico registrati.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. AACTING (2019): "Guidelines for collection, analysis and reporting of farm-level antimicrobial use, in the scope of antimicrobial stewardship" - [https://aacting.org/swfiles/files/AACTING\\_Guidelines\\_V1.2\\_2019.07.02\\_54](https://aacting.org/swfiles/files/AACTING_Guidelines_V1.2_2019.07.02_54)
2. Bassi P., Trevisi P., Salvarani C., Pangallo G., Scali F., Luppi A., Rugna G., Motta V., Diegoli G.,
3. Merialdi G (2021): "Ridurre il consumo di antibiotico: risultati di un progetto PSR in 30 aziende dell'Emilia-Romagna nel triennio 2016-2018" – Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini – XLVI Meeting Annuale, Pescantina (VR), 9-10 settembre 2021, 243-249.
4. Bosco C., Bonilauri P., Rugna G., Luppi A., Fontana M.C., Fiorentini L., Bassi P (2021): "Escherichia coli isolati da matrici patologiche di suino in Emilia-Romagna tra il 2017 e il 2021: valutazione delle resistenze agli antibiotici e dei fattori di virulenza" – Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini – XLVI Meeting Annuale, Pescantina (VR), 9-10 settembre 2021, 121-131.
5. Cantón R & Ruiz-Garbajosa P (2011): "Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes"; COPHAR, 11:477-485.
6. Diegoli G, Granito G, Luppi A, Masera F, Merialdi G, Miraglia V, Mussini P, Trevisi P, Trambajolo G, (2018): "Linee guida Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino", Regione Emilia Romagna, <https://www.alimenti-salute.it/sicurezza-alimentare/linee-guida-sulluso-prudente-antibiotici>
7. Docquier J D (2013): "Gli agenti antibatterici: Meccanismo di azione, sviluppo ed applicazioni cliniche, meccanismi di resistenza"-
8. [https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/27-06-2013/iv-farmacia-antibiotic\\_resistance\\_2013](https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/27-06-2013/iv-farmacia-antibiotic_resistance_2013)
9. EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2019): "Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food"- <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5709>
10. EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2020): "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019"- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2021.6490>
11. EMA - European Medicines Agency (2015) "Principles on Assignment of Defined Daily Dose for Animals (DDDvet) and Defined Course Dose for Animals (DCDvet)" (EMA/710019/2014).

12. Nemeth J, Oesch G, Kuster S P (2014): “Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious”. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 382–395.
13. Poirel L, Madec J Y, Lupo A, Schink A K, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S (2018): “Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*”. *ASM Journals - Microbiology Spectrum* - Vol. 6, No. 4
14. Piano Nazionale di Contrasto dell’Antimicrobico-Resistenza 2017-2020. Allegato al parere della Sezione III del Consiglio Superiore di Sanità del 21 luglio 2017.
15. Poli G., Cocuzza G., Nicoletti G. e Clementi M. (2002): “Microbiologia medica”. UTET, Torino, pp. 731-732.
16. Silley P. (2012): “Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean?”, *Rev. - Off. Int. Epizoot.* , 31 (1): 33-41.
17. UE (2016): DECISIONE DI ESECUZIONE DELLA COMMISSIONE del 14.7.2016 relativa, nel quadro dell’articolo 35 della direttiva 2001/82/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, all’autorizzazione all’immissione in commercio di tutti i medicinali veterinari contenenti “colistina” in associazione con altri agenti antimicrobici per somministrazione orale.
18. UE (2020): Decisione di esecuzione (UE) 2020/1729 della Commissione del 17 novembre 2020 relativa al monitoraggio e alle relazioni riguardanti la resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali, che abroga la decisione di esecuzione 2013/652/UE
19. World Health Organization (2018): “Critically important antimicrobials for human medicine”, 6th revision, Geneva (CH), ISBN 978-92-4-151552-8.

#### **SITOGRAFIA:**

- <https://www.izslt.it/crab/pillole-per-il-veterinario-pratico/>
- [www.clsi.org](http://www.clsi.org)
- [www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_en.pdf)
- [www.eucast.org](http://www.eucast.org)