

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DOPO LA SOSPENSIONE DELL'UTILIZZO DEGLI ANTIBIOTICI

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM PIGS AFTER SUSPENSION OF GROUP ANTIBIOTIC TREATMENT

DE LUCIA A.¹, OSTANELLO F.¹, SMITH R.P.³, DAVIES R.², CARD R. M.²,
RAMBALDI M.¹, MARTELLI F.²

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy; ²Animal and Plant Health Agency (APHA) Bacteriology Department, UK; ³Animal and Plant Health Agency (APHA) Department of Epidemiological Sciences, UK

Parole chiave: antibiotico resistenza, suini, *E. coli*

Key words: antimicrobial resistance, pigs, *E. coli*

RIASSUNTO. Il settore suinicolo è tra primi per consumo di farmaci ad azione antimicrobica. L'uso e l'abuso di questi farmaci si è tuttavia accompagnato all'insorgenza e alla disseminazione di batteri antibioticoresistenti. In questo contesto è interessante verificare se interrompendo l'utilizzo di antibiotici, venga ripristinata la sensibilità di una popolazione batterica resistente. Il presente studio è stato condotto longitudinalmente per un periodo di 11 mesi, durante il quale sono state effettuate tre visite in un allevamento, in cui è stato interrotto l'uso routinario di antibiotici. I risultati ottenuti hanno mostrato che la sospensione dell'utilizzo degli antibiotici ha portato ad una diminuzione delle resistenze per alcune delle molecole testate: ampicillina, trimetoprim-sulfadiazina ed aminoglicosidi seppur in misura inferiore. Nel complesso, gli antibiotici per i quali i ceppi di *E. coli* indicatori, isolati negli animali hanno mostrato più frequentemente resistenza sono: ampicillina, aminoclicosidi, sulfametossazolo e tetraciclina, che corrispondono alle molecole più comunemente utilizzate nell'allevamento del suino. È stato inoltre osservato che la frequenza di *E. coli* resistenti alle molecole testate si differenzia tra le diverse fasi produttive con la fase di svezzamento maggiormente critica, suggerendo l'esistenza di un reservoir di resistenze, nei recinti di questi animali, che potrebbero potenzialmente persistere e diffondersi anche a seguito di una riduzione di utilizzo di tali molecole.

ABSTRACT. The pig sector is among the primary livestock sectors in terms of consumption of antimicrobial drugs. The use and abuse of these drugs over many years has resulted in the emergence and dissemination of antibiotic-resistant bacteria. In this context, it is interesting to verify if the susceptibility of bacterial population resistant to antimicrobials can be restored by halting their use. This study was carried out in a pig farm, which stopped routinely using antibiotics. The farm was followed longitudinally for eleven months and visited 3 times during this period. The restricted antibiotic use seems to have led to a decrease of resistance over time to some of the molecules tested such as ampicillin, trimethoprim-sulfadiazine and aminoglycosides, although on a smaller scale for the latter. High level of resistance among fecal *E. coli* isolates from healthy pigs was observed to tetracycline, sulfamethoxazole, ampicillin, and aminoglycosides reflecting extensive usage of these antimicrobials over many years in the pig industry. Different prevalences of *E. coli* resistant were observed between pig age classes. Isolates from weaners were more likely to be resistant compared with isolates

from finisher pigs. That could be due to the environmental saturation of resistance genes in weaner pens, and the likelihood that these genes could be transferred to other bacteria, maintaining a resistant *E. coli* strains in weaner pens even for a long time after cessation or marked reduction of antimicrobial usage.

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio il fenomeno dell'antibiotico resistenza ha subito un preoccupante incremento. Già nel 1942, pochi anni dopo la scoperta della penicillina, vennero isolati ceppi di *Staphylococcus aureus*, penicillino-resistenti (Lowy, 2003). Oggi, dopo mezzo secolo di uso terapeutico degli antibiotici, il fenomeno della resistenza è diventato un problema globale tanto da essere stato definito dal World Health Organization, una vera e propria emergenza sanitaria per il terzo millennio (WHO, 2017). Nell'allevamento suinicolo italiano viene fatto un ampio utilizzo di molecole ad azione antibatterica, sia a fini terapeutici sia per controllare la diffusione di infezioni batteriche. L'utilizzo degli antimicrobici contribuisce tuttavia all'acquisizione di resistenza agli stessi; batteri patogeni e commensali rispondono alla pressione selettiva esercitata da tali molecole, trasferendo e acquistando materiale genetico da organismi resistenti (Österberg et al., 2016). Tuttavia, i cambiamenti mutazionali dei batteri sono costosi per l'omeostasi cellulare e sono mantenuti solo se necessari in presenza dell'antibiotico (Munita and Arias, 2016).

In questo contesto è importante verificare se interrompendo l'utilizzo di antibiotici e neutralizzando così il vantaggio selettivo di resistenza, venga ripristinata la sensibilità di una popolazione batterica resistente.

Lo scopo del lavoro è stato quello di monitorare nel tempo la prevalenza e quantificare la resistenza ai comuni antibiotici di ceppi di *Escherichia coli*, isolati da campioni di feci, in un allevamento a ciclo chiuso, in cui è stato interrotto l'uso routinario di antibiotici.

MATERIALI E METODI

Allevamento

Lo studio è stato condotto in un allevamento a ciclo chiuso di circa 500 scrofe. I suini in svezzamento, magronaggio e ingrasso erano stabulati in tre diversi capannoni mentre scrofe e scrofette erano allevati all'aperto, in recinti dotati di capannine in grado di alloggiare collettivamente le scrofe gravide.

L'anamnesi riportava la presenza di problemi sanitari causati da *Salmonella* Typhimurim, con sintomatologia clinica nei suini svezzati. Per limitare le perdite produttive, per numerosi anni è stata utilizzata per i suinetti una dieta medicata con apramicina (APR) o trimetoprim-sulfadiazina (SXT). Lo studio è stato condotto longitudinalmente per un periodo di undici mesi, durante il quale sono state effettuate tre visite in allevamento, ad intervallo semestrale.

Prelievo dei campioni

Nel corso di ogni visita sono stati raccolti campioni di feci da 30 suini di ciascuna delle tre fasi produttive (post-svezzamento, magronaggio e ingrasso), per un totale di 90 campioni individuali. Successivamente, i campioni individuali di feci di ciascuna classe di età sono stati utilizzati per creare pool di feci, per un totale di 6 pool per gruppo di età.

Determinazione dei profili di antibiotico-resistenza

Al fine di rilevare e monitorare eventuali cambiamenti nei profili di resistenza e nei livelli di sensibilità agli antibiotici, ogni pool è stato seminato su un terreno selettivo per *Escherichia coli* (ChromAgar ECC). Da ciascuna piastra, dopo essere state incubate a 37 ± 1

°C per 18 ore, 3 colonie sono state selezionate e purificate. Mediante MALDI-TOF si è poi proceduto all'identificazione di genere e specie.

Infine, su tutti gli isolati selezionati e confermati *E. coli*, è stato effettuato il test della Minima Concentrazione Inibente (MIC), usando la tecnica di diluizione agar del protocollo EU (ECDC, 2014). La differenziazione tra ceppi resistenti e sensibili, si è ottenuta utilizzando il valore di cut-off epidemiologico (ECOFF) definito dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: ampicillina, cefotaxime, sulfametossazolo, tetraciclina, streptomomicina, apramicina e florfenicolo. Per gli antibiotici non inclusi nel panel dell'EUCAST i seguenti valori sono stati utilizzati come cutt-off: >16 e ≥ 32 mg/L rispettivamente per streptomomicina e apramicina.

Sono stati inoltre valutati i diversi profili di multi resistenti dei ceppi (MDR) e la loro distribuzione di frequenza nelle diverse categorie produttive, definendo come ceppo MRD un ceppo resistente a tre o più classi antibiotiche diverse.

Analisi statistica

I dati relativi alla determinazione della MIC sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva al fine di rilevare e monitorare eventuali cambiamenti nei livelli di sensibilità agli antibiotici. Il test Linear-by-Linear (EFSA, 2017) è stato utilizzato per verificare l'esistenza di cambiamenti dei livelli di resistenza nel corso delle tre visite in azienda.

Per le diverse categorie produttive, le frequenze di *E. coli* resistenti alle molecole testate sono state comparate usando il test chi quadrato.

I dati sono stati inoltre analizzati anche al fine di valutare la distribuzione di frequenza di isolati multi-resistenti, focalizzando l'attenzione sugli isolati con un numero di resistenze ≥ 3 classi antibiotiche diverse. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). La significatività statistica è stata impostata a valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

In totale sono stati testati 159 isolati di *E. coli*, recuperati dal terreno ChromAgar ECC. In tabella 1 vengono riportate le percentuali dei ceppi resistenti alle molecole testate e le significatività relative alla diminuzione delle resistenze osservate nel corso dello studio longitudinale.

Complessivamente, 108 (67,92%) dei 159 dei *E. coli* indicatori è risultato resistente ad almeno un antibiotico. Le più alte percentuali di resistenza sono state osservate, rispettivamente, per: tetraciclina (54,7%), ampicillina (33,3%), sulfametossazolo (29,5%) e streptomomicina (18,2%). Percentuali inferiori di ceppi resistenti sono state riscontrate per florfenicolo (8,8%) e ciprofloxacina (1,8%). Tutti gli isolati esaminati erano sensibili alle cefalosporine di terza generazione (cefotaxima).

Le resistenze nei confronti delle molecole testate sono diminuite significativamente nel tempo del 23,3% per ampicillina ($p=0,01$) e del 26,5% sulfametossazolo ($p=0,003$). Una tendenza alla riduzione nel tempo delle percentuali di *E. coli* indicatori resistenti, è stata osservata anche per gli aminoglicosidi, l'apramicina ($p=0,06$) e la streptomomicina ($p=0,057$).

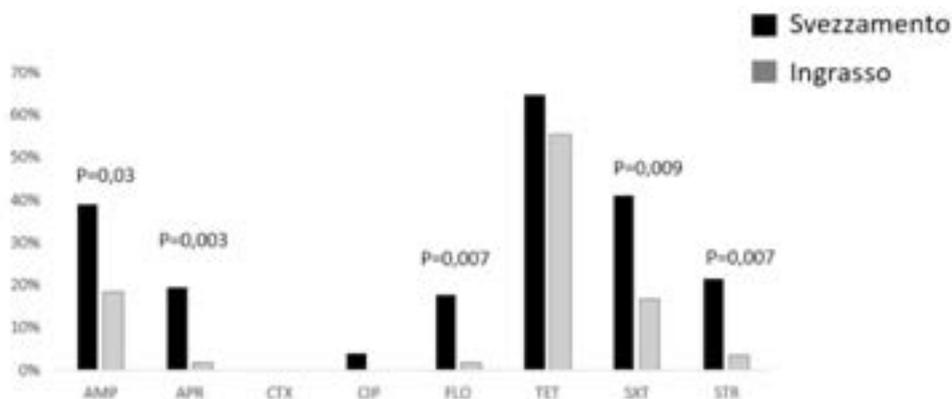
Nella figura 1 viene riportata la distribuzione percentuale (e i relativi valori di significatività statistica) dei ceppi di *E. coli* indicatori resistenti alle molecole testate nelle diverse categorie produttive e raggruppando le tre visite effettuate in azienda. I ceppi isolati da suini in fase svezzamento presentano percentuali di resistenza più elevate nei confronti di tutti gli antibiotici testati rispetto agli animali all'ingrasso.

Tabella 1: Frequenza assoluta e percentuale di ceppi antibiotico resistenti di *E. coli* isolati da pool di feci di suini raccolti durante le tre visite in azienda. *,** indicano rispettivamente un p-value <0,05 e <0,001. I criteri di interpretazione per i valori di MIC sono indicati in mg/L.
Table 1: Frequency and percentage of resistant *E. coli* strains isolated from pool of pig faeces, collected during the three farm visits. *, ** indicate respectively p-value <0.05 and <0.001. MIC values are reported in mg / L

Molecola	Cut-off MIC	Numero di ceppi antibiotico resistenti di <i>E. coli</i> per ciascun prelievo (%)						
		T1 (51)		T2 (54)		T3 (54)		totale
AMP *	>8	26 (50,9%)	12 (22,2%)	15 (27,7%)	53 (33,3%)			
APR	≥32	10 (19,6%)	7 (12,9%)	4 (7,4%)	21 (13,2%)			
CIP	>0,064	1 (1,9%)	2 (3,7%)	0 (0%)	3 (1,8%)			
FLO	>16	4 (7,8%)	5 (9,2%)	5 (9,2%)	14 (8,8%)			
TET	>8	35 (68,6%)	23 (42,5%)	29 (53,7%)	87 (54,7%)			
SXT **	>1	23 (45,0%)	14 (25,9%)	10 (18,5%)	47 (29,5%)			
STR	>16	14 (27,4%)	8 (14,8%)	7 (12,9%)	29 (18,2%)			
CTX	>0,25	0 -	0 -	0 -	0 -			

Figura 1: Percentuali di resistenza agli antibiotici di ceppi di *E. coli* isolati da pool di feci di suini in svezzamento e suini all’ingrasso.

Figure 1: Percentage of resistant *E. coli* strains isolated from weaner and finisher pooled faeces samples.



I profili di multi resistenza e la loro distribuzione nelle varie classi di età sono riportati, rispettivamente, nelle tabelle 3 e 4. Complessivamente, Il 28,9% dei ceppi di *E. coli* è risultato essere MDR.

Confrontando la distribuzione dei ceppi MDR nelle diverse classi d’età, è evidente che gli animali all’ingrasso presentano una frequenza di isolati MDR inferiore rispetto alle classi precedenti (p<0,01). AMP/SXT/TET/AMINO è risultato il profilo di MDR maggiormente osservato nel 32,6% (15 su 46) di tutti i ceppi di *E. coli* MDR.

Tabella 3: Percentuale di ceppi di *E. coli* multi resistenti nelle diverse categorie produttive.
Table 3: Percentage of multi-resistant *E. coli* strains isolated from the different age classes.

Classe di MDR	<i>E. coli</i> indicatori		
	Svezamento (n=51)	Magronaggio (n=54)	Ingrasso (n=54)
6	3,9%	0,0%	0,0%
5	3,9%	3,7%	0,0%
4	17,6%	16,7%	13,3%
3	19,6%	9,3%	3,3%
Totale	45,1%	29,6%	13,0%

Tabella 4: Profili di multi resistenza osservati in *E. coli* multi resistenti.
Table 4: Pattern of multi-resistance *E. coli* isolated.

Profili di MDR	Numero e percentuale di ceppi di <i>E. coli</i> MDR (n=46)	
AMP/SXT/CIP/FLO/TET/AMINO	2	4,3%
AMP/SXT/FLO/TET/AMINO	3	6,5%
AMP/SXT/CIP/FLO/AMINO	1	2,2%
AMP/SXT/TET/AMINO	15	32,6%
AMP/FLO/TET/AMINO	1	2,2%
AMP/SXT/FLO/AMINO	0	0,0%
AMP/SXT/FLO/TET	4	8,7%
AMP/SXT/CIP/TET	0	0,0%
AMP/CIP/TET/AMINO	0	0,0%
AMP/SXT/TET	7	15,2%
AMP/SXT/AMINO	2	4,3%
AMP/TET/AMINO	5	10,9%
SXT/TET/AMINO	3	6,5%
AMP/FLO/TET	3	6,5%

DISCUSSIONE

Come ampiamente prevedibile in base ad osservazioni precedenti, un'elevata percentuale dei ceppi di *E. coli* è risultata resistente alle tetracicline, sulfametossazolo, ampicillina e aminoglicosidi (tabella 1). L'uso estensivo di questi antimicrobici nell'industria suinicola nel corso di molti anni ha favorito l'insorgenza di fenomeni di resistenza nei confronti di questi farmaci (EFSA, 2017). Uno studio precedente ha infatti evidenziato nei suini una più alta probabilità di ospitare *E. coli* resistenti a questi antibiotici rispetto alle altre specie di interesse zootecnico (Sayah et al., 2005).

Una percentuale molto inferiore di isolati (inferiore al 10%) è risultata essere resistente al florfenicolo. Il florfenicolo, introdotto in medicina veterinaria solo 20 anni fa, è considerato un nuovo agente antimicrobico, quindi le popolazioni animali non hanno una lunga storia di esposizione a questo farmaco se comparate all'esposizione ad altre molecole come tetracicline (introdotte nel 1948) o ampicillina (introdotta nel 1961) (Blickwede and Schwarz, 2004). Molti autori sostengono infatti che le resistenze al florfenicolo siano da attribuirsi a meccanismi di co-selezione (Blickwede and Schwarz, 2004; Rosengren et al., 2007) che si verificano quando i geni che codificano per fenotipi resistenti si trovano insieme sullo stesso elemento genetico sia esso un plasmide, un trasposone o un integrone (Chapman, 2003) piuttosto che a seguito dell'utilizzo diretto di tale molecola.

In questo studio poca o nessuna resistenza è stata riscontrata nei confronti dei *critically important antimicrobials* (CIA): cefalosporine di terza generazione (cefotaxime) e fluorochinolone (ciprofloxacina). Gli antibiotici identificati come CIA sono di particolare importanza per la salute umana, poichè il loro utilizzo è ancora efficace per contrastare alcune importanti infezioni batteriche nell'uomo. Per questa ragione, la potenziale o reale resistenza a queste molecole rimane una fonte di grande preoccupazione. Questi antimicrobici devono essere monitorati e il loro utilizzo limitato ai soli casi in cui non esistano alternative disponibili. Pertanto, il fatto che nel presente studio sono state riscontrati bassi livelli di resistenze nei confronti di questi antibiotici è senza dubbio un risultato rassicurante dal punto di vista della salute umana (WHO, 2017).

È ormai assodato che esiste una associazione tra l'esposizione agli agenti antimicrobici e la selezione di batteri resistenti; meno chiaro è se, o in che misura, la riduzione dell'uso di antimicrobici possa invertire il processo e ripristinare la sensibilità di una popolazione batterica resistente.

I risultati del presente studio sembrano indicare che la sospensione dell'uso di antibiotici per un periodo pari a circa un anno ha portato ad una diminuzione delle resistenze seppur in misura diversa a seconda delle molecole testate.

I livelli di resistenza dei *E. coli* indicatori sono diminuiti significativamente nel tempo per ampicillina e trimetoprim+sulfadiazina. ($p < 0,05$). Una riduzione nel numero di *E. coli* indicatori resistenti è stato osservato anche nei confronti degli aminoglicosidi (apramicina e streptomina) seppur non a livelli significativi.

Tuttavia, nonostante l'assenza della pressione selettiva esercitata dagli antibiotici, per alcune molecole (es. tetracicline), le percentuali dei ceppi resistenti si sono mantenute elevate e stabili per tutta la durata dello studio, mostrando pienamente la complessità di questo fenomeno dovuto alla potenzialità di diffusione e mantenimento delle resistenze agli antibiotici. Diversi fattori possono spiegare la mancanza del declino di ceppi antibiotico-resistenti. In primo luogo, potrebbe trattarsi una questione temporale e il declino potrebbe non essersi ancora verificato nel corso degli 11 mesi di durata di questo studio. In secondo luogo, studi precedenti hanno dimostrato l'esistenza di mutazioni compensatorie in grado di minimizzare il costo di fitness che comporta l'acquisizione di resistenza, sia mediata da plasmidi o mutazionale, consentendo così a ceppi resistenti di persistere anche in

assenza di selezione (Enne et al., 2001; Schrag et al., 1997). In terzo luogo, l'ambiente dell'allevamento potrebbe fungere da serbatoio delle resistenze e mantenerle anche a seguito di una riduzione di utilizzo dei farmaci negli animali (McEwen and Fedorka-Cray, 2002). Infatti, una volta presenti in azienda, i batteri resistenti agli antimicrobici possono essere isolati ripetutamente da lotti successivi di animali, anche a fronte di frequenti cicli di pulizia e disinfezione e poca pressione di selezione (Mo, 2016).

Le differenze in termini di resistenze riscontrate nelle diverse categorie produttive potrebbero essere imputabili proprio alle nicchie ecologiche ambientali e alla loro potenzialità di rappresentare dei *reservoir* di geni di resistenza (McEwen and Fedorka-Cray, 2002).

Nei campioni provenienti da animali in fase di svezzamento, stabulati in box nei quali, in passato, sono stati allevati animali che hanno subito dei trattamenti con antibiotici, sono state riscontrate percentuali di resistenza più elevate alle molecole testate e una maggiore frequenza di ceppi MDR. Al contrario, la percentuale di ceppi resistenti e MDR isolati dagli animali all'ingrasso (stabulati in box in cui non sono mai stati allevati animali sui quali sono stati effettuati trattamenti antibiotici di massa) era generalmente inferiore rispetto alle classi di età precedenti (figura 1 e tabella 3).

Infine, dallo studio dei profili di multi resistenza è emerso che le stesse molecole per le quali è stata osservata una maggiore resistenza tra i ceppi di *E. coli* (tetracicline, sulfametossazolo, ampicillina e aminoglicosidi) sono risultate essere componenti del profilo di multi-resistenza maggiormente osservato (tabella 4). Questa osservazione conferma la necessità di porre l'attenzione sull'ipotesi che i geni di resistenza alle suddette molecole potrebbero essere veicolati dai medesimi plasmidi con conseguente co-selezione (EFSA, 2017).

BIBLIOGRAFIA

1. Blickwede, M., & Schwarz, S. (2004). Molecular analysis of florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 58-64.
2. Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International biodeterioration & biodegradation*, 51(4), 271-276.
3. EFSA. (2017). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal*, 15(2), e04694.
4. Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., & Hall, L. M. (2001). Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *The lancet*, 357(9265), 1325-1328.
5. Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), 1265-1273.
6. McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Supplement_3), S93-S106.
7. Mo, S. S. (2016). Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in the Norwegian broiler production pyramid: genetic characterization and determination of risk factors.
8. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2).
9. Österberg, J., Wingstrand, A., Jensen, A. N., Kerouanton, A., Cibin, V., Barco, L., . . . Bengtsson, B. (2016). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs in organic and conventional farming in four European countries. *PloS one*, 11(6), e0157049.
10. Rosengren, L. B., Waldner, C. L., Reid-Smith, R. J., Dowling, P. M., & Harding, J.

- C. (2007). Associations between feed and water antimicrobial use in farrow-to-finish swine herds and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from grow-finish pigs. *Microbial Drug Resistance*, 13(4), 261-270.
11. Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y., & Miller, R. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1394-1404.
 12. Schrag, S. J., Perrot, V., & Levin, B. R. (1997). Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 264(1386), 1287-1291.
 13. WHO. (2017). *The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee, 2017 (including the 20th WHO Model List of Essential Medicines and the 6th Model List of Essential Medicines for Children)*: World Health Organization.