

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2015”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 07/15 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sanità animale

Titolo del progetto: Strumenti molecolari per integrare la sorveglianza: studio delle basi genetiche della resistenza a cefalosporine a spettro esteso in batteri di origine animale in Italia.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Dr. Alessia Franco

SINTESI

Titolo: Strumenti molecolari per integrare la sorveglianza: studio delle basi genetiche della resistenza a cefalosporine a spettro esteso in batteri di origine animale in Italia.

Parole chiave: ESBL, AmpC, ESC-R, *Enterobacteriaceae*, *E.coli*, Salmonella

Testo

La resistenza alle cefalosporine a spettro esteso (ESC-R) è uno dei principali problemi di Sanità Pubblica Veterinaria, per il suo potenziale impatto sui costi sociali derivanti da batteri patogeni zoonosici (come nel caso di Salmonella) o patogeni opportunisti (come *E. coli*), produttori di Beta-Lattamasi a Spettro Esteso (Extended-Spectrum β -lactamase, ESBL) o AmpC [3,4], che diffondono lungo le produzioni primarie degli animali zootecnici e sono in grado di causare infezioni anche nell'Uomo. Negli anni, si è registrato un incremento delle multiresistenze (MDR) e di batteri ESC-resistenti (ESC-R) rilevati nei campioni di animali zootecnici in Italia, in particolare nelle filiere avicole e suine. [3,5,6].

Lo scopo principale del progetto è stato quello di applicare strumenti molecolari per caratterizzare la resistenza alle cefalosporine a spettro esteso (ESC-R) e contemporaneamente caratterizzare, mediante l'applicazione di varie metodologie di laboratorio, gli agenti patogeni zoonosici (Salmonella) e commensali opportunisti (*E. coli*) che le diffondono, isolati da studi di popolazione o sorveglianza passiva in animali zootecnici o da carni derivate.

Presso il CRN-AR, sono state utilizzate varie metodologie di laboratorio allo scopo di caratterizzare le basi molecolari e il "genetic environment" di tali resistenze, tra cui tecniche molecolari "classiche" di subtipizzazione (PCR end-point e sequenziamento tradizionale "Sanger Sequencing") e caratterizzazione molecolare profonda di una parte degli isolati di maggior interesse, tramite l'utilizzo di tecnologie di sequenziamento massivo (Next Generation Sequencing) per scopi di sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing). I dati analizzati con strumenti bioinformatici, sono stati interpretati per valutare la presenza di target molecolari utilizzati per caratterizzare gli isolati e gli elementi genetici accessori (ad esempio, determinazione *in silico* dei geni "housekeeping" nell'analisi MLST, identificazione dei plasmidi mediante tipizzazione dei repliconi, PlasmidMLST) e meccanismi molecolari alla base delle resistenze agli antibiotici (mutazioni puntiformi, geni di resistenza acquisiti).

Complessivamente un totale di N=1009 isolati collezionati nel triennio 2013-2015, sono stati sottoposti a protocolli di screening *ad hoc* di end-point PCRs per l'identificazione delle "famiglie" di geni ESC-R (ESBL o AmpC plasmidiche) [7], una parte di questi isolati è stata poi sottoposta anche ad identificazione dei "gruppi" e di alcuni dei geni specifici coinvolti (es. identificazione delle singole mutanti dei geni all'interno di ogni "gruppo") mediante Sanger-sequencing.

Complessivamente, la maggioranza degli isolati di *Salmonella spp* (106/114, 93.0%) e degli *E. coli* indicatori (728/895, 81.3%) analizzati è risultata positiva per la "famiglia" di geni ESBL CTX-M, mentre 8/114 (7.0%) isolati di *Salmonella spp.* e 94/895 (10.5%) *E. coli* sono risultati positivi per la "famiglia" di geni SHV, e 11/895 *E. coli* indicatori (1.2%) per la sola "famiglia" di geni TEM, di cui 3 isolati positivi per il gene TEM-52.

Per quanto riguarda il rilevamento di geni codificanti AmpC plasmidiche, 2/114 (1.7%) isolati di *Salmonella spp.* e 60/895 (6.7%) isolati di *E. coli* sono risultati positivi per CMY-2, mentre 2/895 (0.2%) isolati di *E. coli* sono risultati positivi per la "famiglia" di geni ACC.

Un subset di 50 isolati ESC-R costituito da 27 *E. coli* e 23 isolati di *Salmonella Infantis* di diversa origine, tutti positivi per la presenza di geni ESBL, sono stati sottoposti a WGS e analisi bioinformatica delle sequenze ottenute. Una parte degli isolati ESC-R mostravano anche un fenotipo

multiresistente (MDR), con un pattern di resistenza fino a 8 classi di molecole, incluse altre 2 classi di molecole HPClAs, ovvero le polimixine (colistina) e i (fluoro)chinoloni. Le basi genetiche rilevate tramite WGS hanno confermato i patterns MDR in tutti gli isolati caratterizzati. Tutti gli isolati sono inoltre risultati positivi anche per la presenza di vari plasmidi (repliconi), potenzialmente coinvolti nel trasferimento dei geni di resistenza riscontrati.

Di grande rilevanza è stata l'identificazione negli isolati di *Salmonella* Infantis ESC-R analizzati, di un plasmide di grandi dimensioni (~280–320 Kb) denominato pESI-like, in grado di veicolare determinanti genetici che conferiscono virulenza (fimbrie, yersiniabactina), un'augmentata capacità di colonizzazione, resistenza e persistenza (*qacEΔ*, *mer*) nell'ambiente.

I genomi sequenziati e assemblati di *S. Infantis* ESC-R sono stati inoltre sottoposti a:

- analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) per determinare le relazioni filogenetiche/fileogeografiche degli isolati, confrontandoli anche con altri isolati provenienti da diversi Paesi Europei e da vari settori delle produzioni primarie, dagli alimenti di origine animale e dal settore umano.

- genotipizzazione tramite core-genome (cg)MLST e realizzazione di Minimum Spanning Trees (MSTs) dai cgSTs ottenuti, per scopi di valutazione della *genetic relatedness* tra due o più isolati anche di origini geografiche differenti, con fini di sorveglianza ed epidemiologia molecolare.

E' stato inoltre necessario chiarire se in alcuni casi fenotipi di resistenza ESC-R fossero o meno legati a mutazioni cromosomiali, in grado di causare una "upregulation" della produzione di enzimi che inattivano i beta-lattamici a spettro esteso (es. AmpC). A tale scopo, un altro gruppo di 33 isolati di *E. coli* collezionati nel triennio 2016-2018, che mostravano un fenotipo ESC-R ma risultavano negativi per la presenza di geni ESBL trasferibili o AmpC plasmidiche, sono stati sottoposti a WGS. I risultati ottenuti hanno mostrato che tali isolati "ospitavano" mutazioni cromosomiali conosciute sul promotore AmpC, in grado di causare una "upregulation" della produzione di beta-lattamasi.

I risultati ottenuti sono stati presentati a internazionali e pubblicati su riviste internazionali peer-reviewed con IF. Questi dati pubblicati saranno utili per scopi di epidemiologia molecolare, per la stima delle prevalenze e valutazione dei trend nel tempo come input per la valutazione del rischio e per scopi generali di prevenzione.