

RC IZSLT 07/15

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

Responsabile scientifico: Alessia Franco

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"
UOC Direzione Operativa Diagnostica Generale
UOS Diagnostica e caratterizzazione molecolare, Laboratorio di Riferimento Nazionale (NRL-AR) e
Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (CRN-AR)**





SCOPO DEL PROGETTO

- Applicare strumenti molecolari per caratterizzare la resistenza alle cefalosporine a spettro esteso (ESC-R)
- 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 (pollame, tacchini da ingrasso, suini e bovini di età inferiore a un anno) o da carni derivate.



DECISIONS

COMMISSION IMPLEMENTING DECISION
of 12 November 2013
on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria
(notified under document C(2013) 7145)
(Text with EEA relevance)
(2013/652/EU)

MATERIALI E METODI (1)

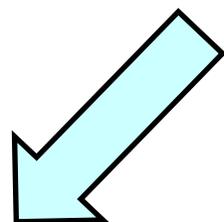
Sono stati individuati i criteri di selezione degli isolati e dei metadati necessari:

- Collezione degli isolati presso il CRN-AR ottenuta dall'attività di Sorveglianza secondo quanto previsto dal Piano Nazionale di Controllo delle Salmonellosi negli avicoli e dall'attività di Monitoraggio attivo (secondo quanto stabilito per il "Piano di monitoraggio armonizzato sulla resistenza agli antimicrobici di batteri zoonotici e commensali" ai sensi della decisione 2013/652/UE), nonché dalla Sorveglianza passiva operata dagli IZZSS sul territorio nazionale.

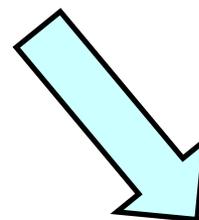


MATERIALI E METODI (2)

Sono state utilizzate varie metodologie di laboratorio allo scopo di caratterizzare le basi molecolari e il “genetic environment” di tali resistenze



Tecniche molecolari “classiche” di subtipizzazione (PCR end-point e sequenziamento tradizionale “Sanger Sequencing”)



Caratterizzazione molecolare profonda di una parte degli isolati di maggior interesse, tramite l’**utilizzo di tecnologie NGS per scopi di sequenziamento dell’intero genoma (Whole Genome Sequencing)**





MATERIALI E METODI (3)

I dati analizzati con strumenti bioinformatici, sono stati interpretati per valutare la presenza di target molecolari e caratterizzare gli isolati e gli elementi genetici accessori, tramite ad esempio:

- ✓ Determinazione *in silico* dei geni “housekeeping” nell’analisi MLST
- ✓ Identificazione dei plasmidi mediante tipizzazione dei repliconi, PlasmidMLST)
- ✓ Meccanismi molecolari alla base delle resistenze agli antibiotici (mutazioni puntiformi, geni di resistenza acquisiti).



MATERIALI E METODI (4)

- Un totale di N=1009 isolati ESC-R collezionati nel triennio 2013-2015 (895 *E. coli* e 114 Salmonelle), 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)
- 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.



PAST



MATERIALI E METODI (5)

Caratterizzazione profonda di un subset di isolati MDR

Un subset di 50 isolati fenotipicamente MDR e positivi per geni ESBL/AmpC (27 *E. coli* e 23 isolati di *Salmonella* Infantis) ottenuti da contenuto cecale/feci o campioni di carni vendute al dettaglio, appartenenti a tutte le specie analizzate (polli, tacchini, suini e bovini), con un pattern di resistenza da 4 fino a 8 classi di molecole (beta-lattamici, polimixine, tetracicline, sulfonamidi, trimetoprim, aminoglicosidi, fenicoli, fluorochinoloni), sono stati sottoposti a WGS e analisi bioinformatica delle sequenze ottenute.



MATERIALI E METODI (6)

Caratterizzazione profonda di un subset di isolati MDR

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 di diversa origine provenienti da altri Paesi Europei
- 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.



MATERIALI E METODI (7)

Studio della presenza di mutazioni cromosomiali AmpC

Un altro gruppo di isolati di *E. coli* (N=33) 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 per indagare la presenza di eventuali mutazioni cromosomiali AmpC, in grado di causare una “upregulation” della produzione di enzimi che inattivano i beta-lattamici a spettro esteso (es. AmpC).

Acquired antimicrobial resistance gene - Results

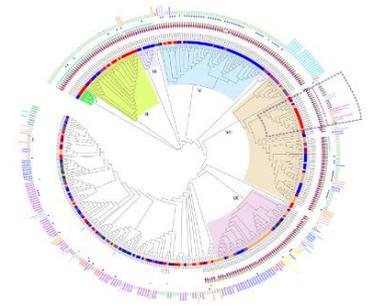
Fosfomicins						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
None found						
Rifampicin						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
None found						
Aminoglycoside						



RISULTATI (1)

- **GENI ESBL:** 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 (con il 62,7% degli isolati positivi per $bla_{CTX-M-1}$ seguiti dal 29,7% positivi per $bla_{CTX-M-15}$), 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 (tutti bla_{SHV-12}), e 11/895 *E. coli* indicatori (1.2%) per la sola “famiglia” di geni TEM, di cui 3 isolati positivi per il gene bla_{TEM-52} .
- **GENI AmpC plasmidici:** 2/114 (1.7%) Salmonelle e 60/895 (6.7%) *E. coli* sono risultati positivi per bla_{CMY-2} , mentre 2/895 (0.2%) *E. coli* sono risultati positivi per la “famiglia” di geni ACC.



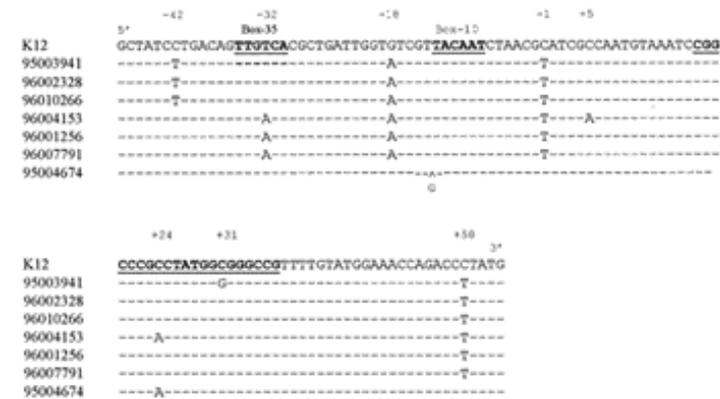


RISULTATI (2)

Caratterizzazione profonda di un subset di isolati MDR

- 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'aumentata capacità di colonizzazione, resistenza e persistenza (*qacEΔ*, *mer*) nell'ambiente.





RISULTATI (3)

Studio della presenza di mutazioni cromosomiali AmpC

Sono state riscontrate in tutti e 33 gli isolati almeno 3 mutazioni cromosomiali conosciute nelle posizioni -1, -18, -42 del promotore AmpC . Inoltre 31/33 isolati sono risultati positivi anche per la mutazione in posizione +58 e solo un isolato anche per la mutazione in posizione +24. Queste mutazioni cromosomiali presenti sul promotore AmpC, sono in grado infatti di causare una “upregulation” della produzione di beta-lattamasi e di conseguenza un fenotipo ESC-R negli isolati che le ospitano.





DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (1)

- Presenza di isolati di *E.coli* indicatori ESC-R piuttosto elevata (895 /1895; 47,2%) nelle produzioni animali analizzate nel corso del biennio 2014-2015. Gli isolati di *Salmonella* spp hanno invece rappresentato il 5,3% (114/2131) delle *Salmonelle* collezionate nel triennio 2013-2015:
- ✓ uso delle aminopenicilline per via orale (amoxicillina), ancora largamente attuato nelle produzioni animali italiane, che esercita infatti pressione di selezione nei confronti di tutti i beta-lattamici, e favorisce l'emergenza e il mantenimento negli allevamenti anche delle resistenze alle cefalosporine a spettro esteso, antibiotici HPClAs, la cui efficacia deve essere conservata il più possibile per poter continuare a curare efficacemente le infezioni invasive nell'Uomo



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (2):

- ✓ La circolazione di isolati ESC-R in grado di acquisire anche ulteriori geni trasferibili (come nel caso di geni *mcr* presenti in 20 isolati di *E.coli* caratterizzati in questo studio), associati a resistenze nei confronti di molecole di importanza critica (HPCIA), come la colistina, contribuisce inevitabilmente a ridurre le possibilità terapeutiche nei casi di infezioni umane invasive trasmesse con gli alimenti.





Parte dei risultati riportati in questo progetto sono stati presentati a congressi internazionali e pubblicati su riviste internazionali peer-reviewed con IF:

-Riviste Internazionali con IF:

- 1) Alba P, Leekitcharoenphon P, Carfora V, et al. Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid. *Microb Genom.* 2020;6(5)
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000365>
- 2) Carfora V, Alba P, Leekitcharoenphon P, et al. Colistin Resistance Mediated by *mcr-1* in ESBL-Producing, Multidrug Resistant *Salmonella* Infantis in Broiler Chicken Industry, Italy (2016-2017), *Front Microbiol.* 2018;9:1880. Published 2018 Aug 17.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01880>
- 3) Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Franco, A., Feltrin, F., Ianzano, A., Caprioli, A., et al. (2018). Molecular epidemiology of *mcr*-encoded colistin resistance in *Enterobacteriaceae* from food-producing animals in Italy revealed through the EU harmonised antimicrobial resistance monitoring. *Front. Microbiol.* 9:1217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01217>

-Abstract presentati a congressi internazionali

- 1) Alba P, Feltrin F, Iurescia M, Amoruso R, Donati V, Caprioli A, Leekitcharoenphon P, Hendriksen R, Franco A, Battisti A. Transferable colistin resistance mediated by the *mcr-1* gene is widespread among *Escherichia coli* and is emerging in *Salmonella* in the Italian fattening turkey industry. 18th Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD), Sorrento (NA) 07-10 Giugno 2017, Abstract Book. Pag. 236.
- 2) Patricia Alba, Pimlapas Leekitcharoenphon, Alessia Franco, Fabiola Feltrin, Angela Ianzano, Andrea Caprioli, Carmela Buccella, Roberta Onorati, Serena Lorenzetti, Luigi Sorbara, Tamara Cerci, Francesco Bottoni, Renè S. Hendriksen, Valeria Bortolaia, Antonio Battisti. High diversity and spread of *mcr* transferable genes encoding colistin resistance among multidrug-resistant (MDR) isolates from primary productions in Italy. AAVM 2018, October 16-19, Rome, Italy

