

CRAB
Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza.



Progetto EFFORT

(Ecology from Farm to Fork Of microbial drug Resistance and Transmission)



Andrea Caprioli, DVM, PhD

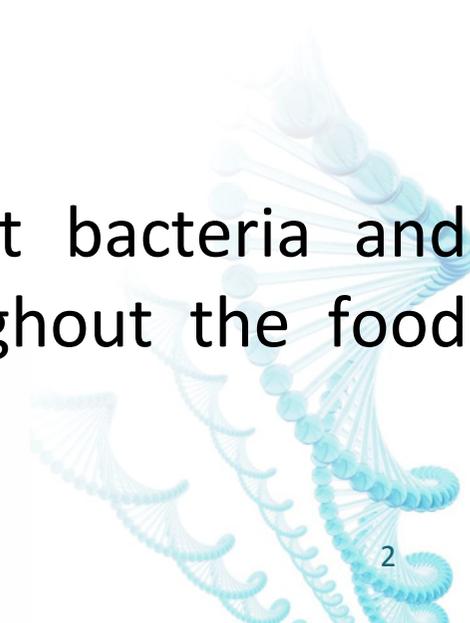
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA

Direzione Operativa Diagnostica Generale



Cos'è il progetto EFFORT

- Tipologia progetto: **Progetto di ricerca Europeo del Settimo Programma Quadro** per la ricerca e lo sviluppo tecnologico. Grant agreement N°: 613754.
- Durata del progetto: **5 anni** (60 mesi). Budget ~ 12 milioni
- Data di inizio del progetto: **01/12/2013**
- Area tematica: Ecology of drug resistant bacteria and transfer of antimicrobial resistance throughout the food chain.



SITO WEB DEL PROGETTO:

<http://www.effort-against-amr.eu/page/project.php>

www.effort-against-amr.eu

Co-funded by the European Union

EFFORT
AGAINST ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Search

Seleziona lingua

NEWS

Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries +

Published on: Oct 6, 2017

All news ▶

EVENTS

International Conference on the Quantification, Benchmarking and Stewardship of Veterinary Antimicrobial Usage +

Date: Feb 27 - 28, 2018

Location: <http://www.aacting.org/international-conference/>

All events ▶

EFFORT against antimicrobial resistance

The EFFORT (Eukaryote from Farm to Food, Of antimicrobial drug Resistance and Transmission) project

Cos'è il progetto EFFORT

- PARTNER COINVOLTI: **20 Istituzioni scientifiche** in rappresentanza di 10 differenti paesi Europei.

- COORDINATORE scientifico del PROGETTO: Prof. Jaap Wagenaar, Utrecht University, Olanda.



- ENTE PARTNER ITALIANO: **Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (IZSLT)**, Direzione Operativa Diagnostica Generale, Centro di Referenza Nazionale e Laboratorio Nazionale di Riferimento per la Antibiotico-Resistenza.



EFFORT coinvolti 10 paesi europei

- Belgio,
- Bulgaria
- Danimarca
- Francia
- Germania
- Italia
- Olanda
- Polonia
- Spagna
- Svizzera



EFFORT obiettivi generali 1

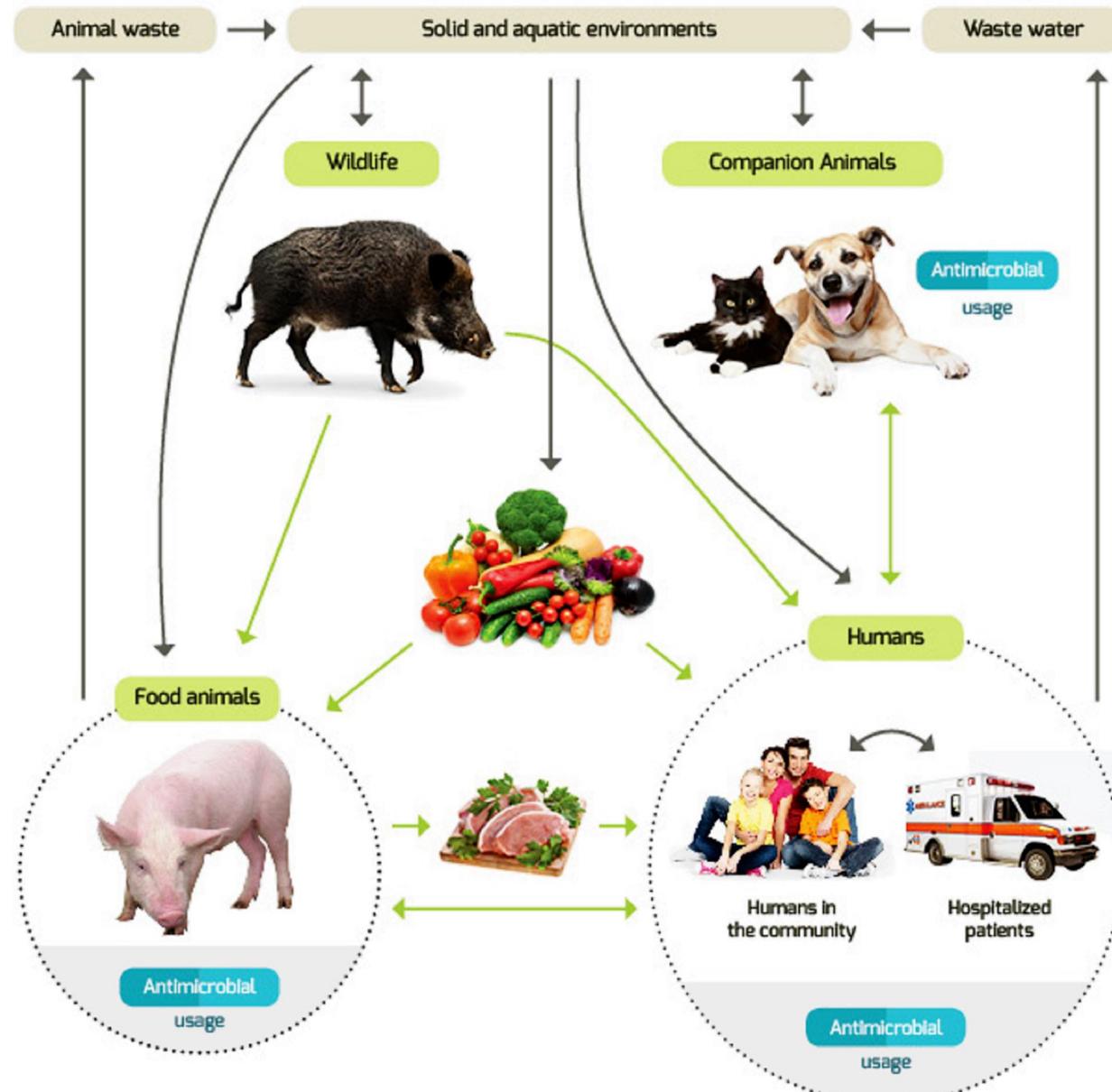
- Meglio comprendere l'eco-epidemiologia dell'antibiotico-resistenza di origine animale.
- Meglio comprendere i complessi meccanismi di trasferimento delle resistenze.
- Quantificare il livello di esposizione al fenomeno all'antibiotico-resistenza attraverso diverse vie di trasmissione dagli animali all'uomo.
- Mettere a punto dei modelli predittivi per valutare e se possibile limitare il rischio di esposizione all'uomo dagli animali.
- Valutare le misure di controllo e di management migliori per arrivare, in Europa, ad una diminuzione dell'uso degli antimicrobici nella pratica veterinaria, senza intaccarne il benessere.

EFFORT obiettivi generali 2

- Utilizzare i risultati al fine di informare la comunità scientifica ed altri stakeholders riguardo le conseguenze dell'antibiotico-resistenza nella catena alimentare.
- Supportare decisioni di tipo politico in termini di prioritizzazione delle opzioni di gestione del rischio lungo la filiera produttiva alimentare, tenendo conto sia aspetti riguardanti lo stato di salute ed il benessere degli animali, sia aspetti di sicurezza alimentare, sia aspetti di tipo economico. Management!

EFFORT obiettivi generali

EFFORT studies the complex **ecology of antimicrobial resistance (AMR)** and the interactions between bacterial communities, commensals and pathogens in animals, the food chain and the environment.



Struttura del progetto

Il progetto EFFORT è strutturato in **10 WPs**

8 Work Packages (WPs) scientifici tra loro interconnessi.

2 WPs di disseminazione delle conoscenze acquisite.



The main objectives per WP are described below.

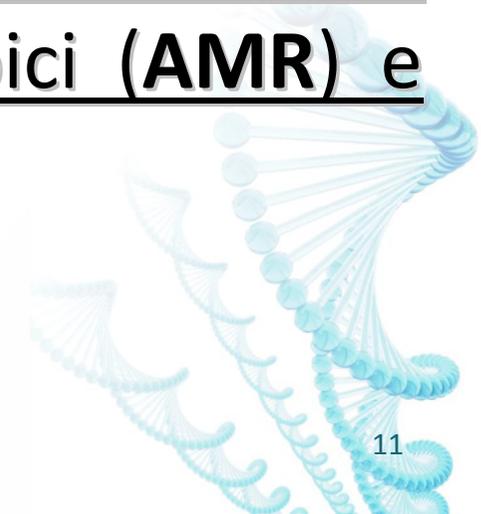
- WP-1 Integrated evidence base for the food chain
- WP-2 Molecular approaches for determining the molecular ecology and epidemiology of antimicrobial resistance genes
- WP-3 Ecology and transfer of resistance mechanisms
- WP-4 Epidemiological analysis of antimicrobial resistance patterns in humans and the environment
- WP-5 Relationship between farming practices, antimicrobial usage, animal health and resistance
- WP-6 Intervention studies aiming at reducing antimicrobial usage and resistance in pig and poultry production
- WP-7 Quantification of exposure to antimicrobial resistance through different transmission routes from animals to humans
- WP-8 Economic impact analysis
- WP-9 Project dissemination and training
- WP-10 Project management

SITO WEB DEL PROGETTO:
<http://www.effort-against-amr.eu/page/project.php>

EFFORT Work Packages

Struttura del progetto (IZSLT)

L'IZSLT è fondamentalmente coinvolto nel **WP1** (**Integrated evidence base for the food chain**) che ha come obiettivi principali la raccolta di campioni e di informazioni epidemiologiche, la messa a punto di protocolli standard, la produzione e la disseminazione di dati sulla resistenza fenotipica agli antimicrobici (AMR) e sul consumo di antibiotici (AMU).



Obiettivi WP1

Effettuati una serie di studi trasversali in nove dei paesi coinvolti su:

- **Animali allevati a scopo zootecnico:** suini, polli, tacchini, bovini, pesci. Per l'Italia solo suini e polli (broiler)



- **Animali selvatici:** cinghiali



- **Animali da compagnia:** Cani e gatti



- **Campioni ambientali:** campioni di **polvere (EDC)** prelevati a livello di allevamenti zootecnici (Per l'Italia suini e polli).

- **Alimenti, campioni umani**



Metodi WP1 ITALIA

Nell'arco di circa un anno effettuati i seguenti campionamenti distribuiti su tutto il territorio nazionale.

- **20 ALLEVAMENTI SUINI:** 25 campioni di feci + 4 EDC + compilazione questionario da ~ 150 domande.
- **20 ALLEVAMENTI POLLI (broiler):** 25 campioni di feci + 4 EDC + compilazione questionario da ~ 100 domande.
- **100 CAMPIONI FECI di CINGHIALI.**
- **50 CAMPIONI FECI di CANE + 50 CAMPIONI FECI DI GATTO** + compilazione questionario ~ 25 domande.



Raccolta dati su management, biosicurezza, welfare, prescrizioni ed utilizzo AB per singoli allevamenti/animali!!



Metodi WP1

Coinvolti liberi professionisti per esecuzione campioni nel Nord Italia. Grazie anche alla collaborazione di colleghi ASL, di veterinari aziendali e degli allevatori !!!!!

Dr. Mario Gherpelli (SUIVET) (Suini e pets)

Dr. Marco Pegoraro (Polli, pets e cinghiali)

Dr. Enrico Giacomini (Pets e cinghiali)



Altri...Dr. Mangili, Corrias, Bruni, Mariti, etc.



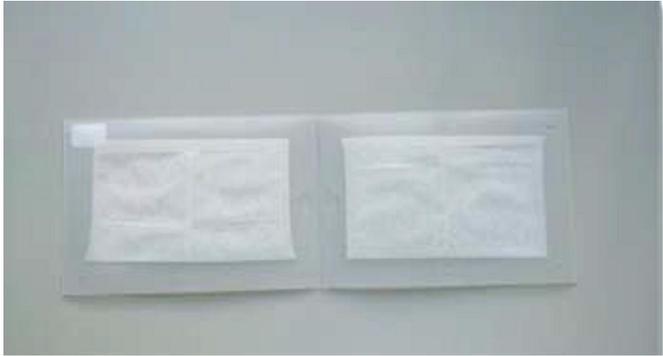
Metodi: campioni feci



AGAINST ANTIMICROBIAL RESISTANCE



Metodi: EDC



Metodi WP1 Italia: alimenti



Effettuati i seguenti campionamenti distribuiti su un'area considerata rappresentativa del territorio nazionale (campioni effettuati nel comune di Roma).

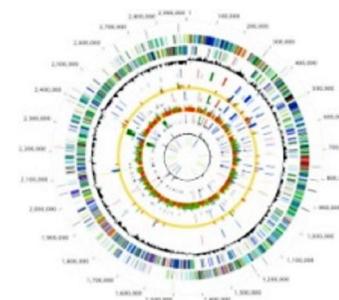
“100 campioni di **carne di suino** prelevati al dettaglio (50 da macellerie e 50 da supermercati).

“100 campioni di **carne di pollo** prelevati al dettaglio (50 da macellerie e 50 da supermercati).

Altre U.O.: anche carni di **bovini, tacchini, trote**.

Metodi: analisi campioni

Estrazione e purificazione DNA da campioni in pool →
Danimarca → **Next generation sequencing (Metagenomic analysis of antimicrobial resistance).**



Estrazione e purificazione DNA campioni individuali → **qPCR**

Isolamento E. coli → **MIC** (EUVSEC plate)



Supplement 3: Schematic overview of handling and storage of fecal samples



Individual fecal sample
Minimal amount of feces collected per individual sample: 3g (preferably more)
For microbiological methods and detailed handling and storage procedures see section IV in the sampling protocol of WP1

METAGENOMIC ANALYSIS & qPCR
Store each individual sample

E. coli
Store every second sample taken on a farm (nr 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20)

Preferably fill each cryotube with the maximum amount of feces (2ml). Store 0.5g per tube as minimum.

Store feces directly without adding broth or chemical

Fill a 2ml cryotube (#1). Store at -80C

Fill a 2ml cryotube (#2). Store at -80C

Suspend the sample 1/10 (w/v) in BPW with 20% glycerol in a 2ml cryotube (#3). Store the at -80C.

Create a pooled sample and store in duplicate

Pooled sample 1
Preferably 0.5 g/individual sample will be used for a pooled sample

Pooled sample 2 (backup)
Preferably 0.5 g/individual sample will be used for a pooled sample

After pooling, the remaining amount of feces of every second sample taken on a farm (nr 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20) will be used for DNA isolation for qPCR. If no feces is left from cryotube #1, it is allowed to use feces from the back up tube. Keep the feces stored pending analysis.

DNA Isolation
Isolate DNA according section IV-C of the sampling protocol

Store the extracted DNA in duplicate at -20C pending analysis.
Detailed shipment procedures need to be developed yet and will be updated in a later stage.

Risultati ancora parziali...work in progress....



Al 4° anno di progetto

L'intero consorzio ha **raccolto/analizzato circa 12,000 campioni** da:

- Allevamenti (suini, polli, bovini, tacchini, pesci)
- Macelli (suini e polli)
- Supermercati, macellai e pescherie (carni di suino, pollo, bovino, tacchino, pesci)
- Animali da compagnia (cani e gatti)
- Animali selvatici (cinghiali)
- Campioni ambientali
- Campioni umani (feci di allevatori e di personale che lavora presso macelli).

Italia > 1400 campioni lavorati



Risultati di laboratorio...work in progress.....



Al 4° anno di progetto

Metagenomica: sequenziati i **360 campioni previsti**.

Meccanismi di resistenza: in fase di avanzamento gli studi per valutare l'ecologia ed i meccanismi di trasferimento dei fattori di resistenza (elementi genetici mobili). EFFORT Catalogue of Plasmids Associated with AMR in Europe can be found online now.

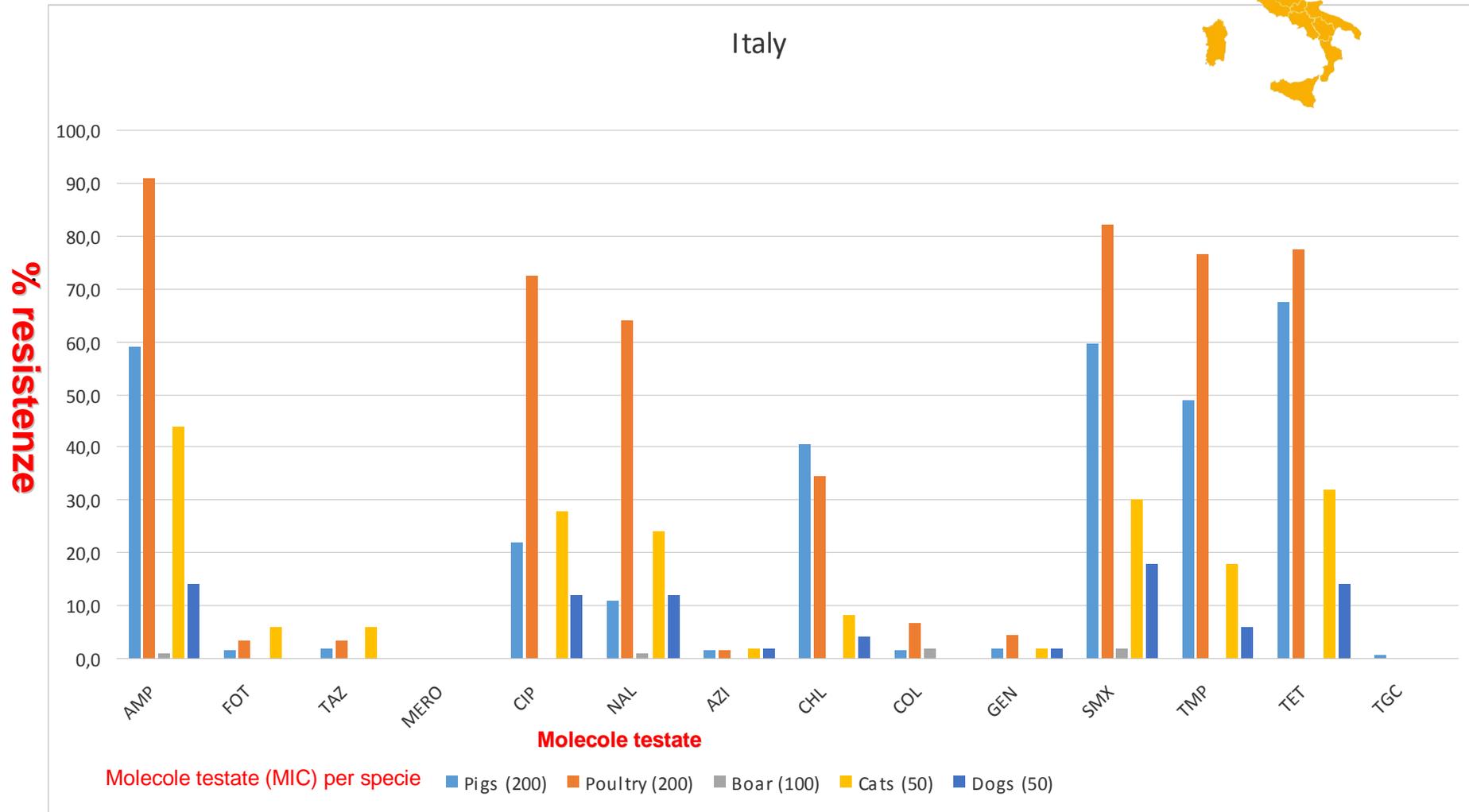
Intervention studies in allevamenti di polli e suini: valutare ed implementare vari tipi di interventi (management) al fine di ridurre l'uso degli antibiotici e quindi l'AMR (100 aziende di polli e 100 di suini. No in Italia).

AST: Effettuato il calcolo della Concentrazione Minima Inibente (MIC), secondo quanto previsto dal progetto **su *E. coli* indicatori** isolati dalle feci (**Italia 600 isolati testati**).



Risultati AMR

ITALIA risultati MIC *E. Coli* indicatori dalle feci



Resistenze fenotipiche riscontrate sono in linea con quanto già rilevato in Italia attraverso i piani di Monitoraggio e le attività descritte durante il corso di questa giornata!!

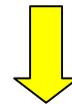
Risultati...work in progress.....AMU



Al 4° anno di progetto

-Una massa imponente di dati e di informazioni relative ai campioni sono state raccolte mediante appositi questionari.

-In corso di elaborazione per poter essere utilizzate nelle previste analisi epidemiologiche/statistiche.



Valutare le relazioni tra i parametri raccolti
(pratiche di management, biosicurezza, benessere animale,
uso degli antimicrobici (AMU))
e
le resistenze riscontrate (AMR)



Ad oggi studiati e quantificati i dati sull'uso degli antimicrobici (AMU) nelle
aziende di suini e polli Í defined daily/course dose for animalsÎ (DDDvet e DCDvet)



EFFORT risultati preliminari Italia AMU....Broilers



Classi molecole impiegate nell'allevamento del pollo da carne (20 aziende):

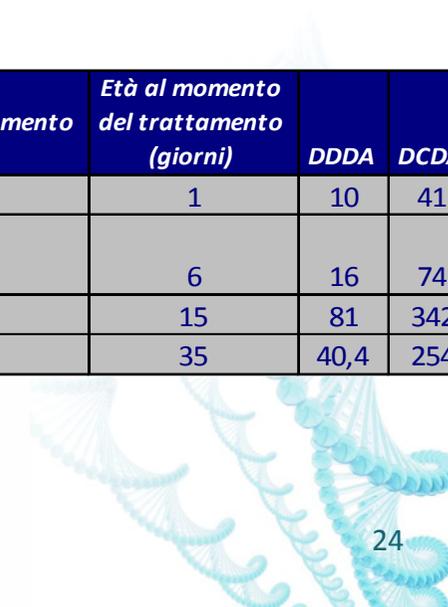
Amoxi + Colistina
Fluoroquinoloni
Macrolidi
Penicilline a spettro esteso
Polimixine
Trim&Sulfa

Durata media dei trattamenti x azienda: 8,2 giorni.

Spesso utilizzo di trattamenti di massa per via orale (acqua da bere)...metafilissi!

Esempio azienda %+

Classi molecole	Principi attivi	Dose d'uso (ml/litro d'acqua)	Via di somministrazione	Durata del trattamento (giorni)	Età al momento del trattamento (giorni)	DDDA	DCDA
Fluoroquinoloni	Enrofloxacin	0,5	orale (acqua da bere)	3	1	10	41
Penicilline a spettro esteso	Amoxicillina	150	orale (acqua da bere)	3	6	16	74
Macrolidi	Tilosina	100	orale (acqua da bere)	3	15	81	342
Trim&Sulfa	Sulfadiazina_TMP	1	orale (acqua da bere)	3	35	40,4	254

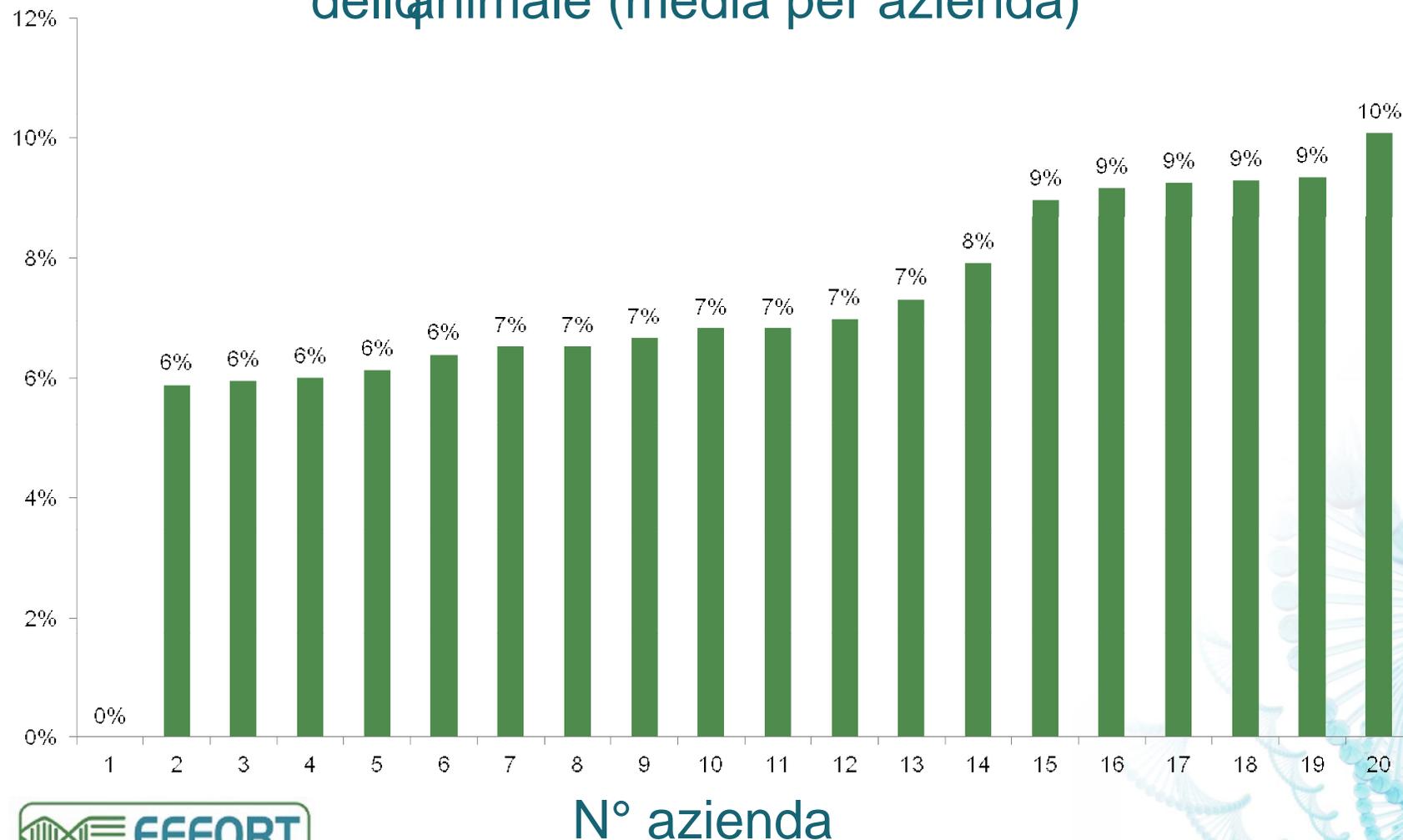


Aziende di POLLI



Incidenza dei trattamenti con antimicrobici sulla base della used daily dose =

Percentuale dei trattamenti in proporzione alla vita dell'animale (media per azienda)





EFFORT risultati preliminari Italia AMU....Suini

” Utilizzo di tutte le classi di molecole, incluse cefalosporine di 3°-4° generazione.



” Spesso utilizzo di trattamenti di massa per via orale (premiscele, mangime medicato, acqua da bere) ã metafilissi!

Durata media dei trattamenti x azienda: 51,3 giorni.





EFFORT risultati preliminari Italia AMU....suini



Esempio azienda %6+

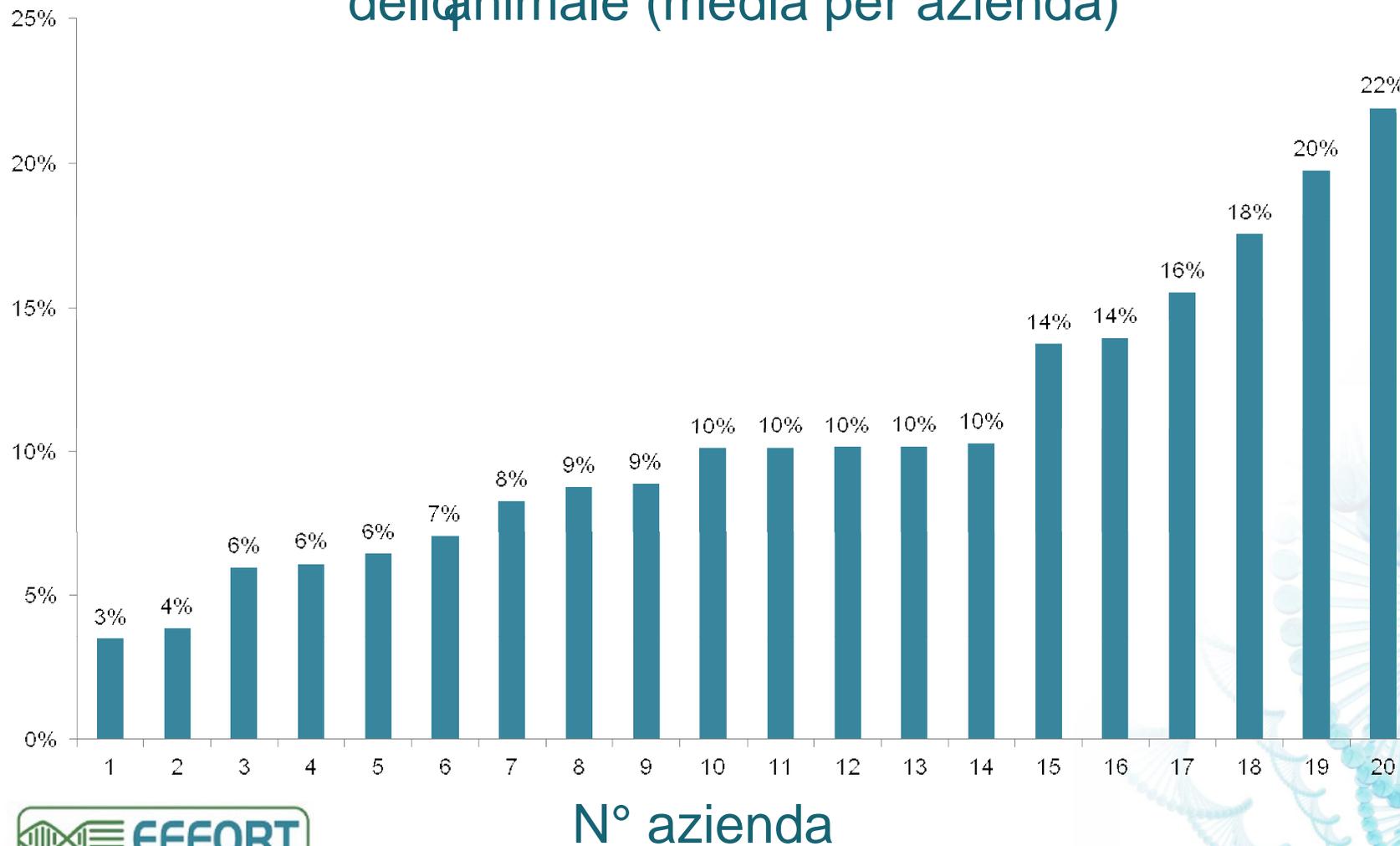
Classi molecole	Principi attivi	Dose d'uso		Via di somministrazione	Durata del trattamento o (giorni)	Età al momento del trattamento (giorni)	Fase produttiva
Fluorochinoloni	Marbofloxacin	0.17	mg/kg animale	Parenterale	1	2	Suinetto lattante
Tetracicline	Chlortetracycline	3	sec	Spray	1	7	Suinetto lattante
Fluorochinoloni	Enrofloxacin	0.05	mg/kg animale	Parenterale	3	15	Suinetto lattante
Penicilline a spettro esteso	Amoxicillin	0.14	mg/kg animale	Parenterale	1	21	Svezzamento
Polimixina	Colistin Sulfate 12%	50	mg/kg animale	Acqua da bere	7	21	Svezzamento
Sulfonamidi e tetracicline	Sulfadimethoxine e Chlortetracycline	25000	mg/kg mangime	Premiscela medicata	5	21	Svezzamento
Amminoglicosidi	Gentamicin	170	ml/litro d'acqua	Acqua da bere	5	45	Post-svezzamento
Fenicoli	Thiamphenicol	0.25	mg/kg animale	Parenterale	2	60	Post-svezzamento
Tetracicline	Doxycycline	50	mg/kg animale	Acqua da bere	5	60	Post-svezzamento
Tetracicline	Doxycycline	57	mg/kg animale	Acqua da bere	5	110	Accrescimento-ingrasso
Fenicoli	Thiamphenicol	0.2	mg/kg animale	Parenterale	2	120	Accrescimento-ingrasso
Fenicoli	Florfenicol	0.075	mg/kg animale	Parenterale	2	120	Accrescimento-ingrasso
Fluorochinoloni	Enrofloxacin	0.05	mg/kg animale	Parenterale	3	120	Accrescimento-ingrasso
Polimixine	Colistin Sulfate 12%	50	mg/kg animale	Acqua da bere	5	135	Accrescimento-ingrasso
Macrolidi	Spiramycin	120	mg/kg animale	Premiscela medicata	5	135	Accrescimento-ingrasso
Chinoloni	Flumequine	60	mg/kg animale	Acqua da bere	5	135	Accrescimento-ingrasso
Fenicoli	Thiamphenicol	0.14	mg/kg animale	Parenterale	2	210	Accrescimento-ingrasso
Penicilline a spettro esteso	Amoxicillin trihydrate	0.02	mg/kg animale	Acqua da bere	3	260	Accrescimento-ingrasso
	Tot=14 differenti P.A.				Tot=62 g		



Aziende di SUINI

Incidenza dei trattamenti con antimicrobici sulla base della used daily dose =

Percentuale dei trattamenti in proporzione alla vita dell'animale (media per azienda)



EFFORT risultati **Italia AMU Conclusioni....**



“Utilizzo consistente di trattamenti di massa per via orale ã metafilissi!

“Utilizzo di trattamenti per una parte consistente della vita produttiva dell'animale!

“Utilizzo consistente anche di CIA! *%più facili+e %più sicuri del risultato+*

“Risultati in linea con reports ESVAC *%sorveglianza+europea* del consumo di antimicrobici veterinari.



EFFORT Risultati



" Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries" submitted to Nature Microbiology

Preprint Available on bioRxiv: <https://doi.org/10.1101/194647>



HOME | AI

New Results

Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries

 Patrick Munk,  Berith Elkær Knudsen,  Oksana Lukjachenko,  Ana Sofia Ribeiro Duarte, Roosmarjin E. C. Luiken, Liese Van Gompel,  Lidwien A. M. Smit, Heike Schmitt, Alejandro Dorado Garcia, Rasmus Borup Hansen,  Thomas Nordahl Petersen,  Alex Bossers,  Etienne Ruppé, Haitske Graveland, Alieda van Essen, Bruno Gonzalez-Zorn, Gabriel Moyano, Pascal Sanders, Claire Chauvin, Julie David, Antonio Battisti, Andrea Caprioli, Jeroen Dewulf, Thomas Blaha, Katharina Wadepohl, Maximiliane Brandt, Dariusz Wasyl, Magdalena Skarzyńska, Magdalena Zajac, Hristo Daskalov, Helmut W. Saatkamp, Katharina D. C. Stärk, Ole Lund,  Tine Hald,  Sünje Johanna Pamp, Håkan Vigre, Dick Heederik, Jaap Wagenaar, Dik Mevius, Frank Møller Aarestrup

doi: <https://doi.org/10.1101/194647>



Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries

The metagenomic analysis will provide a complete quantitative determination of all known antimicrobial resistance genes present in the fecal samples

Sampling over 9000 animals, we have quantified and characterized the acquired resistance gene pools (resistomes) of 181 pig and 178 poultry farms from nine European countries, generating more than 5,000 gigabases of DNA sequence. In the study we explore the abundance and diversity of antimicrobial resistance (AMR) genes and identify a large country effect, both on total AMR levels, resistome composition and AMR gene richness. This effect was partially explained by country-specific antimicrobial usage

[◀ Back to News & Events](#)

Last changed: 10-08-2017 at 5:47 PM Published On: 10-06-2017



" **Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries**" submitted to Nature Microbiology

➤ The pig and poultry resistomes were very different in abundance and composition.

➤ There was a significant country effect on the resistomes, more so in pigs than poultry.

➤ We found higher AMR loads in pigs, while poultry resistomes were more diverse.



" **Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries**" submitted to Nature Microbiology

- We found that the total acquired AMR level, was associated with the overall country-specific antimicrobial usage in livestock and that countries with comparable usage patterns had similar resistomes. >Italia e Spagna.
- Some countries had large differences between farms.
- We detected several recently described, critical AMR genes, including *mcr-1* and *optrA*, the abundance of which differed both between host species and countries.

" Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries" submitted to Nature Microbiology

Italia



- Tra i paesi con più elevato livello di AMR....e AMU
- Italia seconda dietro la Spagna in termini di più elevata ricchezza di geni di resistenza.
- I 4 campioni con le più elevate resistenze da suini Italiani.
- L'Italia possiede le più elevate resistenze ai fenicoli.
- Il nuovo gene *optrA* (resistenza trasferibile al linezolid) ed il gene *mcr-1* (colistina) rilevati maggiormente in Italia ed in Bulgaria.



The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] under grant agreement n°613754.



Grazie per l'attenzione!
Domande?



Universiteit Utrecht



WAGENINGEN UNIVERSITY
WAGENINGENUR

DTU



SAFOSO

intomics
from data to biology

anses
French agency for food, environmental
and occupational health & safety



PorQ⁺

BfR
Bundesinstitut für Risikobewertung



VION



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana



vetworks

ARTIC
INTERNATIONAL MANAGEMENT SERVICES

ILSI Europe
International Life Sciences Institute

