

La resistenza ai macrolidi negli agenti zoonosici e opportunisti Gram-negativi oggetto di sorveglianza nazionale IZSLT 02/18

UOC Direzione Operativa Diagnostica Generale - Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (CRN-AR) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri".

ABSTRACT

E' di crescente preoccupazione lo sviluppo di resistenze ai macrolidi, classe di antibiotici "salvavita" nell'uomo, dovuto al loro frequente ed elevato utilizzo nella pratica veterinaria. Ad oggi, le conoscenze disponibili sulle basi genetiche e sulla prevalenza dei geni di resistenza ai macrolidi in batteri Gram-negativi che circolano nelle filiere zootecniche italiane, sono ancora estremamente limitate. In tale progetto sono state indagate le basi genetiche della resistenza ai macrolidi su un set di isolati di agenti patogeni zoonosici (*Salmonella* spp. e *Campylobacter jejuni*) e di indicatori/commensali opportunisti (*E. coli*) rappresentativi delle produzioni animali (polli da carne, tacchini, bovini e suini) e delle carni derivate sul territorio italiano, tramite l'utilizzo di tecniche molecolari "classiche" e caratterizzazione profonda mediante Whole Genome Sequencing (WGS).

METHODS

E. coli



- 71 isolati di *E. coli* (n=56 da campioni cecali di animali zootecnici e n=15 da carne) con un valore di MIC per l'azitromicina uguale o superiore a 8 mg/L, collezionati negli anni 2015-2017 e 2018 nell'ambito del Piano di monitoraggio armonizzato AMR secondo la Decisione 2013/652/EU. La matrice utilizzata per il campionamento nella produzione primaria è stata il contenuto cecale. Gli isolati sono stati sottoposti a protocolli di screening *ad hoc* di end-point PCR per la ricerca dei geni trasferibili *mphA/mphB* e in alcuni casi anche ad un ulteriore protocollo di screening di end-point PCR per la ricerca dei geni trasferibili *ermA/ermB/ermC*
- 50 isolati di *E. coli* produttori di ESBL/AmpC fenotipicamente resistenti ad azitromicina (MIC >16 mg/L), ottenuti da campioni cecali di bovini e suini e carni derivate nell'ambito delle attività del Piano di monitoraggio AMR condotte nel 2019 sottoposti a WGS.

Salmonella spp

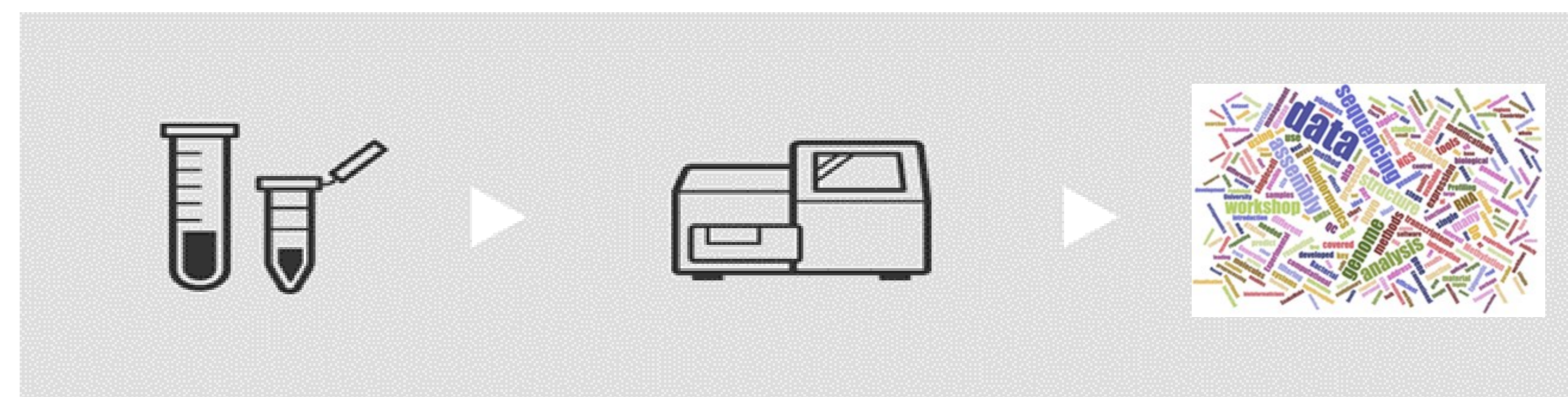
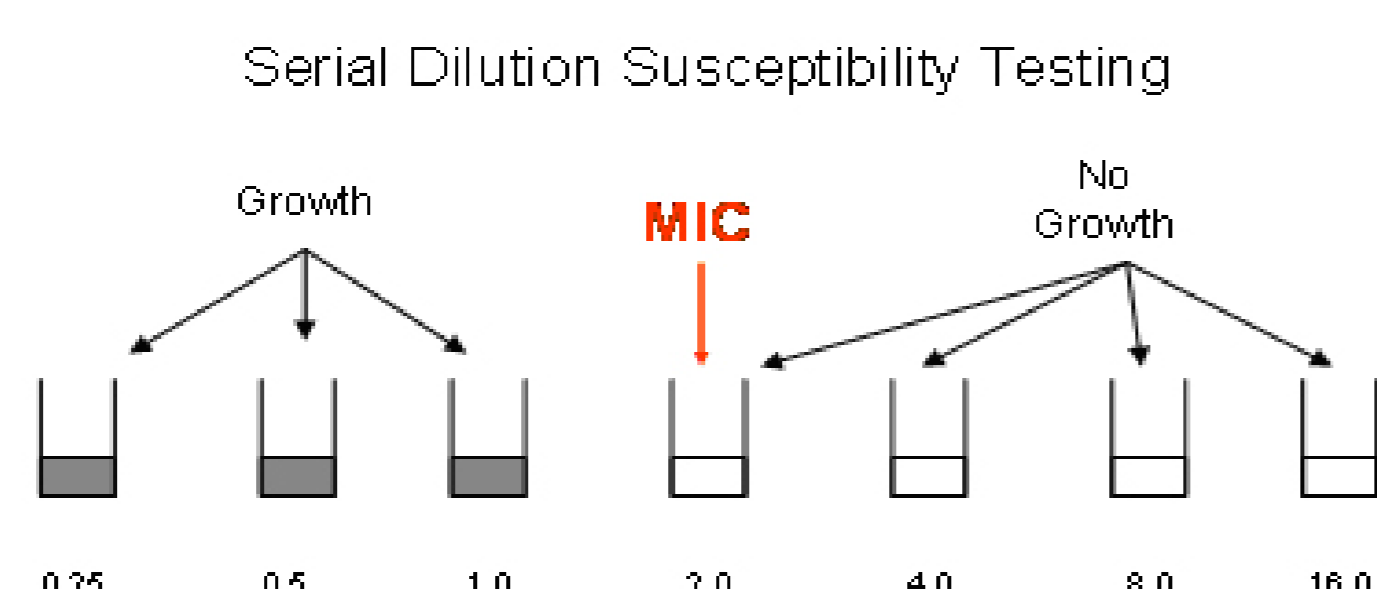


- 113 isolati di *Salmonella* spp. (n=112 da animali zootecnici e n=1 da carne) con un valore di MIC per l'azitromicina uguale o superiore a 8 mg/L, collezionati negli anni 2015-2017 e 2018 nell'ambito di vari contesti di campionamento (Piano di monitoraggio armonizzato AMR secondo la Decisione 2013/652/EU, Piani nazionali di controllo e Sorveglianza passiva. Le matrici utilizzate per il campionamento nella produzione primaria sono state: sovrascarpe, polvere, feci, tamponi di carcasse. Gli isolati sono stati sottoposti a protocolli di screening *ad hoc* di end-point PCR per la ricerca dei geni trasferibili *mphA/mphB* e in alcuni casi anche ad un ulteriore protocollo di screening di end-point PCR per la ricerca dei geni trasferibili *ermA/ermB/ermC*
- 166 isolati italiani di *S. Infantis* di origine umana, animale e alimentare (2001-2017) precedentemente sottoposti a WGS e inclusi in un ampio studio Europeo pubblicato nel 2020.

Campylobacter jejuni



4 isolati di *C. jejuni* fenotipicamente resistenti all'eritromicina provenienti da campioni cecali di pollo, ottenuti nell'ambito del Piano di monitoraggio armonizzato AMR del 2016, sottoposti a WGS



RESULTS

Azitromicina valore di MIC	N°isolati negativi per mphA-mphB	N° isolati positivi per mphA	N° isolati positivi per mphA/mphB	N° isolati positivi per mphB	Totale
8 mg/L	12	2	0	3	17
16 mg/L	3	5	1	1	10
32 mg/L	8	14	0	1	23
64 mg/L	1	8	0	0	9
128 mg/L	0	12	0	0	12
Totale	24	41	1	5	71

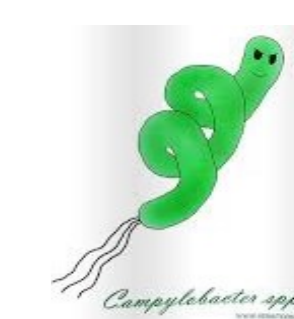
Tabella 1: Risultati end-point PCR per la ricerca dei geni trasferibili *mphA/mphB* in *E. coli* (2015-2017-2018) in relazione ai valori di MIC per azitromicina.



Tabella 2: Risultati WGS per la ricerca dei geni di resistenza trasferibili ai macrolidi in *E. coli* (2019) in relazione ai valori di MIC per azitromicina.

Matrice	Specie	Azitromicina MIC (mg/L)	mph(A)	erm(C)	erm(B)	mph(B)	mph(E)	mef(B)	mef(C)	mph(G)	msr(E)	Totale
Contenuto cecale	Bovino	32	4			3						7
Contenuto cecale	Bovino	64	2			1						3
Contenuto cecale	Bovino	128		1								1
Carne	Bovino	64						1	1			2
Carne	Bovino	128					1	1	1			3
Carne	Suino	64	2						1	1		4
Carne	Suino	128	1	1								2
Contenuto cecale	Suino	32	4	1					1	1		7
Contenuto cecale	Suino	64	5	1					2	2		10
Contenuto cecale	Suino	128	10		4	1	1	3	2	3	1	25
Totale	/	/	28	1	7	5	1	4	8	9	1	64

L'analisi WGS ha rilevato che nessuno degli isolati presentava geni di resistenza accessori codificanti resistenza ai macrolidi, mentre tutti gli isolati presentavano la mutazione A2075G a livello del gene che codifica per il rRNA 23S, generalmente associata ad elevati livelli di resistenza all'eritromicina in *Campylobacter* spp



Azitromicina valore di MIC	N°isolati negativi per mphA-mphB	N° isolati positivi per mphA	N° isolati positivi per mphB	Totale
8 mg/L	66	0	0	66
16 mg/L	37	1	3	41
32 mg/L	1	0	0	1
64 mg/L	0	3	0	3
128 mg/L	0	1	1	2
Totale complessivo	104	5	4	113



Tabella 3: Risultati end-point PCR geni trasferibili *mphA/mphB* in *Salmonella* spp. (2015-2017-2018) in relazione ai valori di MIC per azitromicina. Diversi geni di resistenza ai macrolidi sono stati riscontrati anche nella collezione dei 166 isolati di *S. Infantis* sottoposti a WGS. In particolare 53 isolati sono risultati positivi al gene *mphA*, un isolato al gene *ere(A)* e 13 isolati a *mef(B)* in 5 casi associati a *mphA*.

DISCUSSION

- Elevata diffusione *mphA* negli isolati con valori di MIC per l'azitromicina superiori a 16 mg/L ma anche in un numero consistente di *E. coli* con valori di MIC uguali o inferiori a 16 mg/L, considerati quindi suscettibili secondo il manuale EFSA recentemente pubblicato.
- Necessari ulteriori approfondimenti riguardanti le strutture specifiche dell'operone *mph(A)* negli isolati resistenti ad azitromicina
- Presenza dei geni *erm* in otto degli isolati MDR analizzati, insieme ad altri geni di resistenza accessori per altre classi di molecole: meccanismi di co-selezione