

RESISTENZA A CHINOLONI ED ANTIBIOTICI ETA-LATTAMICI IN CEPPI DI *Escherichia coli* ISOLATI DA BROILERS IN DANIMARCA ED IN ITALIA

QUINOLONE- AND ETA-LACTAM- RESISTANCE IN *Escherichia coli* FROM DANISH AND ITALIAN BROILER FLOCKS

Bortolaia V.¹, Trevisani M.², Guardabassi L.¹, Bisgaard M.¹, Venturi L.³, Delle Donne G.², Bojesen A.M.¹

¹ Department of Veterinary Pathobiology - University of Copenhagen, Denmark

² Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Università di Bologna

³ Dipartimento di Sanità Pubblica - Azienda USL di Ravenna

SUMMARY

The prevalence of quinolone- and -lactam-resistant *E. coli* was investigated among healthy broiler flocks in Denmark and Italy. In Denmark, sock samples were collected from 10 parent flocks and 10 offspring flocks, according to the procedure currently used for the surveillance of *Salmonella* in the EU. Samples were enriched in McConkey broth and streaked on McConkey agar plates added with nalidixic acid (32 g/ml), ciprofloxacin (2 g/ml), ampicillin (32 g/ml), cefotaxime (2 g/ml) or ceftiofur (8 g/ml). The -glucuronidase test was performed for verification of presumptive *E. coli*. The same methods were used to analyse sock samples collected from 6 Italian broiler flocks. PCR with primers for the CTX-M-type extended-spectrum -lactamases (ESBLs) was performed on cephalosporin-resistant isolates. While resistance to ampicillin and nalidixic acid was widespread in both countries, resistance to ciprofloxacin and cephalosporins was more common among Italian flocks. In Denmark, ciprofloxacin resistance was only detected in 1 parent flock without any history of quinolone usage and none of the flocks was positive for cephalosporin-resistant *E. coli*. In Italy, resistance to ciprofloxacin was detected in all flocks and resistance to ceftiofur and cefotaxime were detected in 5 flocks. Primers specific for the CTX-M-type ESBLs generated PCR amplicons from isolates from 3 of these flocks. In industrialized countries, the poultry production system is highly standardized, and therefore comparable. However, the use of broad-spectrum antimicrobials is particularly limited in Danish poultry production. Accordingly, the results of this study could reflect the different policies in antimicrobial usage between the two countries.

Key words

Escherichia coli, quinolone, cephalosporin, broiler, ESBL

INTRODUZIONE

In medicina umana e veterinaria sono documentate importanti ripercussioni sanitarie ed economiche conseguenti all'insorgenza, diffusione e persistenza di geni che codificano determinanti di antibiotico-resistenza a livello di popolazioni batteriche (10, 13).

In concomitanza o in seguito ad infezioni causate da batteri antibiotico-resistenti è possibile incorrere in episodi di aumentata morbosità e limitata

efficacia terapeutica di farmaci attualmente disponibili.

In questo studio viene esaminata la prevalenza di *E. coli* resistenti a (fluoro)chinoloni ed agenti -lattamici a livello di allevamento avicolo, in animali sani.

Le attuali tecniche di macellazione e lavorazione del pollame non possono escludere la contaminazione accidentale di carcasse da parte di microrganismi presenti nel tratto intestinale degli animali macellati.

L'esposizione ad alimenti di origine animale contaminati da *E. coli* antibiotico-resistenti rappresenta una minaccia per la sanità pubblica ed è un'eventualità che coinvolge sia i ceppi patogeni che i ceppi commensali.

Il rischio per la salute pubblica può conseguire sia ad infezione zoonotica, sia al trasferimento di geni di resistenza a microrganismi del tratto intestinale umano, tramite elementi genetici mobili (4, 5, 6, 7, 9, 12). Quest'ultima evenienza è stata ad esempio descritta per alcuni geni che codificano enzimi responsabili di resistenza alle cefalosporine, designati -lattamasi a spettro amplificato (ESBLs) (16).

MATERIALI E METODI

E. coli sono stati isolati da feci campionate con calzari (11). In Danimarca, i campioni sono stati raccolti in 10 allevamenti di parents della linea carne e in 10 allevamenti di broilers di età compresa tra le 3 e 4 settimane.

In Italia, precisamente in Emilia-Romagna, l'indagine ha riguardato 1 allevamento di parents (linea carne) e 5 allevamenti di broilers di età eterogenea. L'anamnesi sull'utilizzo di antibiotici ha riportato che negli allevamenti danesi, ad eccezione di 1, non era stato fatto uso di antibiotici; in Italia, in 1 allevamento non erano stati utilizzati antibiotici.

In laboratorio, i calzari sono stati posti in arricchimento con brodo McConkey in proporzione 1:10, ed incubati a 37°C durante la notte. Dieci microlitri di brodo sono stati seminati su 5 differenti tipi di piastre: agar McConkey addizionato con ampicillina

(32 g/mL), acido nalidixico (32 g/mL), ciprofloxacina (2 g/mL), ceftiofur (8 g/mL), e cefotaxima (2 g/mL). Le piastre sono state incubate a 37°C durante la notte e i presuntivi *E. coli* sono stati confermati mediante il test della -glucuronidasi.

Sugli isolati con fenotipo di resistenza alle cefalosporine è stata effettuata la PCR con primers per ESBLs del tipo CTX-M.

RISULTATI

La tabella 1 contiene i risultati del rilevamento fenotipico di *E. coli* antibiotico-resistenti, a livello di allevamento.

La PCR per ESBL del tipo CTX-M ha generato ampliconi in tre dei cinque allevamenti dove sono stati isolati *E. coli* resistenti alle cefalosporine.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Questo studio evidenzia un'elevata prevalenza di *E. coli* resistenti ad ampicillina ed acido nalidixico negli allevamenti esaminati di entrambi i Paesi. La prevalenza di *E. coli* resistenti alla ciprofloxacina è molto bassa negli allevamenti danesi ed elevata negli allevamenti italiani oggetto dell'indagine, dove è stata inoltre osservata un'elevata prevalenza di resistenza alle cefalosporine. Fra i determinanti genetici di resistenza alle cefalosporine sono state evidenziate -lattamasi del tipo CTX-M, enzimi codificati da geni presenti su plasmidi che rappresentano una problematica emergente in medicina veterinaria (2, 3). In Danimarca non sono stati isolati *E. coli* resistenti alle cefalosporine.

Tab. 1 - Prevalenza di *E. coli* antibiotico-resistenti a livello di allevamento, in DK e IT

Agente antimicrobico ¹	DK		IT	
	nAP ² /nAT ³	(%)	nAP ² /nAT ³	(%)
AMP	20/20	(100)	6/6	(100)
CTX	0/20	(0)	5/6	(83.3)
CTF	0/20	(0)	5/6	(83.3)
NAL	20/20	(100)	6/6	(100)
CIP	1/20	(5)	6/6	(100)

¹ ampicillina (AMP); cefotaxima (CTX); ceftiofur (CTF); acido nalidixico (NAL); ciprofloxacina (CIP).

² numero di allevamenti positivi.

³ numero totale di allevamenti analizzati.

Esiste un'associazione confermata tra la quantità di antibatterici utilizzati e la comparsa di batteri antibiotico-resistenti, e le indicazioni preliminari che emergono da questo studio potrebbero rappresentare un'ulteriore conferma (1, 8, 14).

I fluorochinoloni e gli agenti β -lattamici sono farmaci per i quali è prioritario preservare l'efficacia terapeutica poiché sono caratterizzati da ampio spettro d'azione e tossicità relativamente bassa (15, 17). Il medico veterinario, operatore di sanità pubblica, svolge un ruolo insostituibile sia mediante un utilizzo prudente degli antibiotici, limitando l'uso di molecole ad ampio spettro ai casi di effettiva neces-

sità, sia tramite un monitoraggio dell'insorgenza di antibiotico-resistenza.

Stabilire piani di monitoraggio per il rilevamento di batteri antibiotico-resistenti negli animali d'allevamento permette di elucidare la dinamica di popolazioni batteriche resistenti e di limitare fallimenti terapeutici in medicina veterinaria. E' inoltre uno strumento necessario per produrre dati per un'analisi del rischio al quale il consumatore è esposto in seguito ad assunzione di alimenti potenzialmente contaminati da microrganismi resistenti agli antibiotici.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bager, F. (2000). DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14:271-274.
- 2) Blanc, V., R. Mesa, M. Saco, S. Lavilla, G. Prats, E. Miró, F. Navarro, P. Cortés, and M. Llagostera. (2006).. ESBL-and plasmidic class C β -lactamases-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet. Microbiol.* 118:299-304.
- 3) Briñas L., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Sáenz, M. C. Porrero, L. Domínguez, and C. Torres. 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1262-1264.
- 4) Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 – sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio.
- 5) Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, and R. Helmuth. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemoter.* 52:489-492.
- 6) Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, K. Smith, T. T. O'Bryan, and S. Tatini. (2005). Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J. Infect. Dis.* 191:1040-1049.
- 7) Jensen, L. B., H. Hasman, Y. Agersø, H. D. Emborg, and F. M. Aarestrup. (2006). First description of an oxyiminocephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *J. Antimicrob. Chemoter.* 57:793-794.
- 8) Miles, T., W. McLaughlin, and P. D. Brown. (2006). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research.* 2:7.
- 9) Mølbak, K. (2004). Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans – the public health consequences. *J. Vet. Med.* 51:364-369.
- 10) Salyers, A. A., and C. F. Amabile-Cuevas. (1997). Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Agents Chemoter.* 41:2321-2325.
- 11) SANCO/2083/2006. Baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in flocks of turkeys in the EU.
- 12) Schroeder, C. M., D. G. White, and J. Meng. (2004). Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiol.* 21:249-255.
- 13) Singer, R. S. (2003). Epidemiology and ecology of antibiotic resistance, p. 27-34. *In* M. E. Torrence, and R. E.

Isaacson (ed.), Microbial food safety in animal agriculture – current topics, 1st ed. Iowa State Press.

14) Van den Bogaard, A. E., N. London, C. Driessen, and E. E. Stobberingh. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J. Antimicrob. Chemoter. 47:763-771.

15) Webber, M., and L. J. V. Piddock. (2001). Quinolone resistance in *Escherichia coli*. Vet. Res. 32:275-284.

16) Winokur, P. L., D. L. Vonstein, L. J. Hoffman, E. K. Uhlenhopp, and G. V. Doern. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2716-2722.

17) Yang, H., S. Chen, D. G. White, S. Zhao, P. McDermott, R. Walker, and J. Meng. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J. Clin. Microbiol. 42:3483-3489.