

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ANTIBIOTICA DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE ALLEVATE E DA AVIFAUNA SELVATICA

Fiorentini L.¹, Taddei R.², Casadio M.¹, Parigi M.¹, Vicari N.³, Massi P.¹, Tosi G.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sezione Diagnostica di Forlì – Via Marchini 1 – Forlì (FC) – forli@izsler.it

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sezione Diagnostica di Bologna – Via P.Fiorini 5 – Bologna (BO).

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sezione Diagnostica di Pavia – Strada Campeggi 59/61 – Pavia(PV)

Summary

The *in vitro* susceptibility to 18 antibiotics of 85 *Escherichia coli* strains (50 strains recovered from different wild bird species and 35 strains recovered from poultry farms) isolated in Emilia Romagna region in the period 2013-2014 was studied. Resistances to 16 antibiotics was observed (both in poultry species than in wild birds) and the following percentages of resistance (respectively for domestic and wild species) were obtained: penicillin G (100% and 100%), amoxicillin (68% and 21%), enrofloxacin (62% and 13%), ceftiofur (54% and 16%), tylosin (97% and 100%), tetracycline (84% and 30%), tilmicosin (100% and 100%), neomycin (16% and 5%), lincomycin/spectinomycin (81% and 70%), trimethoprim/sulfamethoxazole (38% and 12%), oxacillin (97% and 100%), erythromycin 97% and 100%), tiamulin (100% and 100%), lincomycin (100% and 100%), streptomycin (30% and 8%) and spectinomycin (69% and 64%). A significant correlation of the resistance of *E.coli* strains isolated from poultry was noted towards amoxicillin, ceftiofur, enrofloxacin and tetracycline. The intestinal tract of wild birds is a reservoir of antibiotic resistance *E.coli* strains and it is also remarkable that multiresistant *E.coli* isolates were detected both in poultry species than in wild birds.

INTRODUZIONE

L'antibioticoresistenza è un fenomeno biologico naturale che si verifica per l'emergenza e la diffusione di fattori di resistenza batterica agli antibiotici ed è innescata ed amplificata dalla pressione selettiva esercitata sulle popolazioni microbiche attraverso l'uso di questi farmaci. L'utilizzazione inadeguata di antimicrobici terapeutici in medicina umana e veterinaria, l'impiego di queste molecole per fini non terapeutici (la cosiddetta "chemioprolifassi antibiotica") e l'inquinamento ambientale da antimicrobici accelerano la comparsa e la propagazione di microrganismi resistenti. Le maggiori criticità al momento riguardano i ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA), i ceppi di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) e i ceppi batterici Gram negativi (in particolare *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL/AmpC).

Il settore zootecnico è particolarmente coinvolto dal problema. L'Unione Europea e le autorità sanitarie nazionali hanno deciso di fronteggiare il problema attraverso misure

restrittive ma soprattutto incentivando un impiego “prudente e ragionato” dell’uso degli antibiotici (1,2). E’ inoltre necessario implementare le misure di biosicurezza e, laddove possibile, di profilassi immunizzante nonché il ricorso a prodotti alternativi. Tra i paesi europei maggiormente attivi nella riduzione dell’uso degli antibiotici in medicina veterinaria, l’Olanda ha adottato fin dal 2008 un programma che si prefigge un calo del 70% delle vendite di antibiotici nel settore zootecnico alla fine del 2015 (prendendo come riferimento i quantitativi venduti nel 2009) (7). Il programma olandese classifica gli antibiotici nelle seguenti categorie:

- Prima scelta: comprende antibiotici per i quali non si prevede una limitazione all’impiego purchè quest’ultimo sia ovviamente destinato esclusivamente a scopi terapeutici. Vi appartengono alcune beta-lattamine (come ad esempio la penicillina G e la penicillina V), le tetraciline, i sulfamidici (anche associati al trimethoprim), i fenicoli (tiamfenicolo e florfenicolo) alcuni macrolidi (ad esempio la tilosina ma non nel settore avicolo), le pleuromutiline, la rifaximina, la bacitracina e l’avilamicina.
- Seconda scelta: il loro impiego va giustificato in funzione della diagnosi e dell’applicazione di test di sensibilità *in vitro*. Questi ultimi si possono evitare solo per terapie di emergenza. Vi appartengono alcune beta-lattamine (amoxicillina, ampicillina, acido clavulanico) alcune cefalosporine (come cefalexina e cefapirina), alcuni macrolidi (come la tilosina e la tilmicosina per le specie avicole e la tulatromicina), alcuni aminoglicosidi (apramicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, streptomina, spectinomicina) e alcuni fluorochinoloni (flumequina, acido oxolinico).
- Terza scelta: vi appartengono antibiotici considerati di importanza critica per la salute umana. Il loro impiego in ambito veterinario va riservato a terapie individuali come conseguenza di indagini batteriologiche seguite da prove di sensibilità *in vitro* e in assenza di alternative. Questo gruppo comprende alcune cefalosporine (cefoperazone, ceftiofur e cefquinome) e alcuni fluorochinoloni (tra cui enrofloxacin e marbofloxacin).
- E’ infine vietato l’impiego degli antibiotici non inclusi nelle categorie appena descritte. In particolare il divieto si riferisce agli antibiotici non inclusi nella tabella 1 del Regolamento CE 37/2010 (che stabilisce l’elenco delle sostanze farmacologicamente attive consentite e ne fissa i limiti massimi residuali negli alimenti di origine animale) oppure elencati (come sostanze proibite) nella tabella 2 del medesimo regolamento (8).

A livello diagnostico è fondamentale un’attività costante di studio delle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi batterici isolati al fine di valutare nel tempo l’andamento del fenomeno e di evidenziare tempestivamente la comparsa di nuove problematiche. Questa attività deve comprendere sia le specie allevate che la fauna selvatica.

Il presente studio si è indirizzato sullo studio delle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi di *Escherichia coli* isolati da specie avicole allevate e da specie appartenenti alla avifauna selvatica.

Escherichia coli è un normale costituente della flora intestinale dell’uomo e della maggior parte delle specie animali, sia domestiche che selvatiche. Può essere

facilmente disseminato in svariati ecosistemi attraverso acqua, terreno e alimenti. Questo microrganismo è frequentemente implicato in patologie enteriche e sistemiche (di interesse umano e veterinario) per la cui terapia è spesso richiesto l'impiego di antibiotici. Di conseguenza non è infrequente la comparsa di fenomeni di antibiotico-resistenza tra cui particolare importanza viene attribuita ai ceppi produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL/AmpC) resistenti agli antibiotici beta-lattamici e, in particolare, ad alcune penicilline e cefalosporine.

Escherichia coli è considerato il più diffuso tra i batteri patogeni aviari. Colpisce infatti tutte le specie allevate, a qualsiasi età e in tutte le tipologie produttive. E' solitamente responsabile di infezioni sistemiche (favorite da fattori condizionanti di natura virale e/o ambientale) e, più raramente, di infezioni localizzate (quali ad esempio il coligranuloma o malattia di Hjarre). L'infezione da *Escherichia coli* è responsabile di gravi perdite economiche legate agli indici di mortalità, alla riduzione delle performance zootecniche e all'aumento degli scarti in fase di macellazione.

L'avifauna selvatica svolge un ruolo importante nella diffusione dell'antibiotico-resistenza in vari modi:

- Come "sentinella" in grado cioè di colonizzare, in funzione dell'habitat di appartenenza, ceppi batterici antibiotico-resistenti provenienti da attività umane o allevamenti zootecnici.
- Come "serbatoio" e potenziale diffusore (in particolare per le specie migratorie) di ceppi antibiotico-resistenti.
- Come possibile fonte di antibiotico-resistenza per l'uomo e le specie animali allevate.

MATERIALI E METODI

Campionamento/Specie avicole allevate

Per questo studio sono stati impiegati 35 ceppi di *Escherichia coli* isolati e identificati dalle principali specie avicole allevate in Emilia Romagna. In particolare sono stati impiegati, nel 2013, 9 ceppi di *Escherichia coli* isolati da allevamenti di polli da carne (3 ceppi), tacchini da carne (3 ceppi), quaglia, faraona e anatra (1 ceppo ciascuno). Sono stati inoltre impiegati 26 ceppi di *Escherichia coli* isolati nel 2014 dalle seguenti specie e tipologie produttive: pollo da carne (13 ceppi), tacchino da carne (6 ceppi), gallina ovaiole da consumo (3 ceppi), riproduttori pesanti di pollo (3 ceppi) e quaglia (1 ceppo).

Sono stati considerati casi clinici di colibacillosi (caratterizzati da lesioni macroscopiche di natura fibrinosa coinvolgenti differenti organi tra cui fegato, milza, pericardio e, negli animali in deposizione, ovaio e ovidutto) e casi clinici di altra natura ma caratterizzati anch'essi dall'isolamento di ceppi di *Escherichia coli* a diffusione sistemica.

Campionamento/Avifauna selvatica

Per questo studio sono stati impiegati 50 ceppi (28 riferiti al 2013 e 22 riferiti al 2014) di *Escherichia coli* isolati e identificati dalle seguenti specie selvatiche: gazza (*Pica pica*, 18 ceppi), Ghiandaia (*Garrulus glandarius*, 16 ceppi), gabbiano (*Larus melanocephalus*, 3 ceppi), civetta (*Athene noctua*, 2 ceppi), cornacchia (*Corvus cornix*, 2 ceppi), gallinella d'acqua (*Gallinula chloropus*, 1 ceppo), gruccione (*Meros apiaster*, 1 ceppo), sparviero (*Accipiter nisus*, 1 ceppo), martin pescatore (*Alcedo atthis*, 1

ceppo), storno (*Sturnus vulgaris*, 1 ceppo), tarabusino (*Ixobrychus minutus*, 1 ceppo), gufo (*Asio otus*, 1 ceppo), rondone (*Apus apus*, 1 ceppo), falco (Gen. *Falco*, 1 ceppo). I ceppi impiegati nello studio sono stati isolati e identificati da carcasse recuperate sul territorio regionale dalle autorità competenti oppure provenienti da centri di raccolta e recupero autorizzati. In tutti i casi considerati si trattava di soggetti privi di lesioni anatomico-patologiche riferibili a colibacillosi. L'isolamento di *Escherichia coli* veniva perciò eseguito dal contenuto intestinale.

Prove batteriologiche e test di sensibilità antibiotica in vitro

Per l'isolamento dei ceppi di *Escherichia coli* sono stati utilizzati terreni selettivi e differenziali. Una volta in coltura pura i ceppi sono stati identificati su base biochimica mediante l'impiego di test miniaturizzati (Microgen®, Biogenetics). Sui ceppi isolati sono state condotte prove in vitro di sensibilità agli antibiotici attraverso la tecnica della Minima Concentrazione Inibente (MIC). Per la prova è stato impiegato un sistema standardizzato (MIC AVIPRO PLATE®, LohmannTierzucht GmbH) progettato per la medicina veterinaria ed in particolare, per la patologia aviaria, costituito da pannelli (piastre microtiter a 96 pozzetti) contenenti 1 µg di diversi antibiotici disidratati di impiegati sia in campo umano che veterinario. Gli antibiotici utilizzati (e la relativa abbreviazione) sono i seguenti: Amoxicillina (AMX), Colistina (COL), Cefotiofur (CET), Enrofloxacin (ENR), Eritromicina (ERY), Lincomicina (LIN), Lincomicina/Spectinomicina (LIS), Neomicina (NEO), Oxacillina (OXA), Penicillina G (PEN), Rifampicina (RAM), Spectinomicina (SPT), Streptomicina (STR), Tetraciclina (TET), Tiamulina (TIA), Tilmicosina (TILM), Tilosina (TLS), Trimethoprim/sulfametossazolo (T/S).

Gli antibiotici impiegati appartengono alle seguenti categorie: beta-lattamici (penicillina G, amoxicillina, oxacillina e cefotiofur), tetraciclina (tetraciclina), macrolidi (tilosina, tilmicosina, eritromicina), aminoglicosidi (neomicina, streptomicina, spectinomicina), fluorochinoloni (enrofloxacin), pleuromutiline (tiamulina), lincosamidi (lincomicina), sulfonamidi (trimethoprim+sulfametossazolo), rifamicine (rifampicina), polimixine (colistina) e lincosamidi+aminoglicosidi (lincomicina+spectinomicina).

Il test è progettato per determinare la minima concentrazione inibente nei confronti di batteri Gram positivi e Gram negativi. Per la definizione della sensibilità nei confronti degli antibiotici sono stati considerati i *breakpoints* forniti dal kit e riferiti alle performance di un ceppo di riferimento di *Escherichia coli* (ATCC 25922). Nel dettaglio i valori di *breakpoint* considerati (espressi in µg/ml) sono i seguenti: Penicillina G: >2 (resistente); Amoxicillina: 8 (intermedio); Enrofloxacin: ≤0,25 (sensibile); Cefotiofur: ≤ 2 (sensibile); Tilosina: ≤0,25 (sensibile); Tetraciclina: ≤ 2 (sensibile); Tilmicosina: >16 (resistente); Neomicina: ≤ 8 (sensibile); Lincomicina+spectinomicina: ≤ 8/32 (sensibile); Trimethoprim+sulfametossazolo: ≤ 0,5/9,5 (sensibile); Oxacillina: >2 (resistente); Colistina: ≤ 2 (sensibile); Eritromicina: >4 (resistente); Tiamulina: >16 (resistente); Lincomicina: >4 (resistente); Streptomicina: ≤200 (sensibile); Rifampicina: ≤50 (sensibile); Spectinomicina: ≤ 32 (sensibile).

La metodica impiegata si può riassumere nel modo seguente:

è stato allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame a partire da una sospensione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario di 0,5. In seguito la metodica prevedeva le fasi seguenti:

- centrifugazione della sospensione per 2-3 secondi.
- Inoculazione di 100 µl di sospensione standardizzata in 11 ml di Mueller Hinton Broth.
- Inoculazione di tutti i pozzetti del pannello MIC AVIPRO PLATE® con 100 µl di sospensione batterica per pozzetto.
- Incubazione per 18-24 ore a 37°C in aerobiosi.
- Lettura dei risultati: la MIC è stata calcolata come la più alta diluizione dell'antibiotico che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico le MIC sono state definite come maggiori-uguali (\geq) rispetto alla concentrazione più alta. Quando non si verificava crescita batterica in tutte le concentrazioni, le MIC sono state considerate come minori o uguali (\leq) rispetto alla concentrazione più bassa.

Analisi statistica

La correlazione tra la resistenza agli antibiotici dei ceppi isolati da fauna selvatica e di quelli isolati da specie domestiche allevate è stata calcolata mediante test esatto di Fisher (GraphPad Software: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/catMenu>). Un P-value $<0,05$ (test a due code) è stato considerato come statisticamente significativo.

RISULTATI

I risultati sono riportati nelle tabelle 1,2 e 3. Di seguito vengono riportati i risultati dello studio suddivisi in base alle categorie di appartenenza degli antibiotici considerati nel presente lavoro:

BETA-LATTAMICI: il meccanismo d'azione degli antibiotici appartenenti a questo gruppo si basa sull'inibizione della sintesi della parete cellulare batterica. Nell'ambito di questo gruppo esiste distinzione tra antibiotici che agiscono solo nei confronti dei batteri Gram positivi e antibiotici ad ampio spettro. Al primo gruppo appartengono, tra le molecole studiate nel presente lavoro, penicillina G e oxacillina (nei cui riguardi i ceppi di *E.coli* testati hanno infatti manifestato una resistenza pressochè totale), mentre nel secondo gruppo rientrano amoxicillina e ceftiofur (quest'ultimo appartenente alla classe delle cefalosporine). Nei confronti dell'amoxicillina lo studio ha messo in evidenza una resistenza del 68% e del 54% dei ceppi testati (isolati rispettivamente da specie domestiche e selvatiche). Nei confronti del ceftiofur la percentuale di resistenza è stata del 19% e del 8% dei ceppi testati (isolati rispettivamente da specie domestiche e selvatiche). La resistenza a queste due molecole è risultata significativamente correlata ai ceppi isolati da specie domestiche allevate.

FLUOROCHINOLONI: lo studio ha messo in evidenza un elevato numero di ceppi di *E.coli* isolati in ambito zootecnico resistenti al principio attivo enrofloxacin (62%). Appare inoltre interessante il riscontro di resistenza sul 13% dei ceppi isolati da specie selvatiche; la resistenza all'enrofloxacin è risultata significativamente correlata ai ceppi isolati da specie domestiche.

SULFONAMIDI: lo studio ha evidenziato una resistenza all'associazione trimethoprim+sulfametossazolo del 38% dei ceppi isolati da specie allevate e del 12% dei ceppi isolati da avifauna selvatica. Tale associazione è di largo impiego in avicoltura soprattutto nell'allevamento del pollo da carne.

POLIMIXINE: l'unica molecola appartenente a questo gruppo considerata nello studio

è la colistina sicuramente uno tra gli antibiotici di maggior utilizzo nel settore avicolo. La resistenza nei confronti delle polimixine è molto rara ed è stata segnalata solo nei confronti di *Salmonella* spp. I risultati dello studio confermano questo dato.

AMINOGLICOSIDI: le tre molecole appartenenti a questo gruppo considerate in questo lavoro (neomicina, streptomina e spectinomina) hanno presentato livelli di resistenza differenti (16%, 30% e 69% nelle specie domestiche; 5%, 8% e 64% in quelle selvatiche). E' noto tuttavia che fenomeni di cross-resistenza all'interno di questa categoria non sono frequenti (a differenza ad esempio di sulfonamidi e fluorochinoloni). E' interessante notare come i livelli più alti di resistenza riguardino la spectinomina, ampiamente utilizzata (a differenza di neomicina e streptomina) nel settore avicolo spesso in associazione con altri antibiotici (lincomicina, tilosina).

TETRACICLINE, LINCOSAMIDI, PLEUROMUTILINE e MACROLIDI: come era logico attendersi (data la scarsa efficacia di questi antibiotici nei confronti di *Escherichia coli*) la resistenza dei ceppi batterici testati in questo lavoro è risultata totale nei confronti di lincomicina e tilmicosina, mentre la maggior parte dei ceppi è risultata resistente a tilosina, eritromicina, tiamulina e tetraciclina. Questa tendenza è stata riscontrata sia nei ceppi "domestici" che "selvatici".

RIFAMICINE: tutti i ceppi isolati sia da specie domestiche che selvatiche si sono rivelati sensibili alla rifampicina. Questo antibiotico non viene impiegato nel settore avicolo.

CEPPI MULTIRESISTENTI: sono state riscontrate resistenze multiple nei ceppi di *Escherichia coli* testati nel presente lavoro. Il fenomeno è stato osservato sia in ceppi isolati da specie allevate che in ceppi isolati da avifauna selvatica. In particolare, nell'ambito delle molecole efficaci nei confronti dei Gram negativi, va segnalata la resistenza ad almeno un beta lattamico ad ampio spettro (amoxicillina e/o ceftiofur) associata a quella nei confronti dei fluorochinoloni (enrofloxacin) in 19 ceppi su 35 isolati da specie domestiche (54%). Tra questi, 8 ceppi (23% sul totale degli esaminati) evidenziavano una resistenza anche nei confronti di almeno un aminoglicoside e 10 ceppi (35% sul totale degli esaminati) presentavano una resistenza estesa anche all'associazione trimethoprim+sulfametossazolo. Un ceppo presentava infine una resistenza multipla "beta-lattamici ad ampio spettro+trimethoprim+sulfametossazolo+aminoglicosidi". L'associazione della resistenza a beta-lattamici ad ampio spettro e fluorochinoloni veniva osservata anche in 5 ceppi su 50 (10%) isolati da avifauna selvatica. Tra questi ultimi un ceppo presentava una resistenza estesa anche ad almeno un aminoglicoside, mentre due ceppi evidenziavano una resistenza anche nei confronti dell'associazione trimethoprim+sulfametossazolo.

DISCUSSIONE

Antibiotico-resistenza di *E.coli* isolati da specie avicole allevate: lo studio ha dimostrato la presenza di fenomeni di resistenza nei confronti di 16 molecole su 18 considerate nello studio. Tra le molecole impiegate nel settore avicolo solo la colistina ha evidenziato una totale efficacia *in vitro*. La resistenza alle polimixine è rara. Tuttavia secondo le indicazioni dell'Health Council olandese anche per l'uso di questa molecola andrà prevista una graduale riduzione limitata attualmente dalla mancanza di alternative adeguate (7). Appaiono preoccupanti i livelli di resistenza nei confronti

di beta-lattamici ad ampio spettro, fluorochinoloni, aminoglicosidi (soprattutto per quanto riguarda la spectinomina), macrolidi e sulfonamidi. Questa preoccupazione riguarda sia il comparto zootecnico che le possibili ripercussioni per la salute pubblica. Nel primo caso perché si tratta di molecole ampiamente utilizzate nella terapia delle infezioni batteriche, la cui perdita di efficacia può comportare seri problemi soprattutto per la mancanza di valide alternative. Tuttavia gli elevati livelli di resistenza nei confronti di questi antibiotici possono essere la diretta conseguenza proprio del loro massiccio impiego, in passato, spesso in modo irrazionale (ad esempio amoxicillina, trimetoprim+sulfonamidi, tilosina e aminoglicosidi frequentemente impiegati nella cosiddetta “chemioprophylassi”).

Nel secondo caso (l’impatto cioè sulla sanità pubblica) gli aspetti da considerare sono i seguenti:

- Amoxicillina e ceftiofur sono tra i beta-lattamici che possono influenzare la comparsa di ceppi ESBL/AmpC, considerata una delle principali emergenze della antibiotico-resistenza in campo umano.
- La resistenza nei confronti degli aminoglicosidi può compromettere (essendo molto frequenti i fenomeni di resistenza crociata) l’efficacia di antibiotici appartenenti a questo gruppo considerati di importanza critica per la salute pubblica (amikacina, arbekacina, gentamicina, netilmicina, tobramicina e streptomina).
- Fluorochinoloni: anche in questo caso fenomeni di resistenza crociata possono compromettere l’efficacia di antibiotici considerati di importanza cruciale nella terapia di alcune infezioni batteriche nell’uomo.
- I macrolidi, pur non influenzando la comparsa di ceppi ESBL/AmpC, sono considerati di prima scelta nel trattamento di alcune infezioni umane tra cui *Legionella* spp., *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp.. L’impiego irrazionale di questi antibiotici in allevamento potrebbe aumentare il rischio di diffusione di ceppi di *Campylobacter* resistenti. Va infatti ricordato che le specie avicole rappresentano uno dei principali serbatoi di questo microrganismo.

Antibiotico-resistenza di *E.coli* isolati da avifauna selvatica: la prima segnalazione di fenomeni di antibiotico-resistenza nella fauna selvatica ha riguardato proprio una specie aviaria (piccione) e risale al 1978 (9). Da allora altri studi hanno evidenziato questo fenomeno in diverse specie (anatre, oche, rapaci, cormorani, gabbiani, tortore e passeriformi) in varie zone del pianeta (3,5,6). Nel nostro paese l’unico studio riportato in letteratura riguarda la descrizione di ceppi di *Escherichia coli* dotati di antibiotico-resistenza isolati da gabbiani in Puglia (4). Nel presente lavoro è stata considerata un’ampia varietà di specie selvatiche (sia stanziali che migratorie) recuperate in diverse zone dell’Emilia Romagna. I ceppi di *Escherichia coli* isolati da queste specie hanno presentato fenomeni di antibiotico-resistenza coincidenti (sia pure con livelli di prevalenza inferiori) con quelli riscontrati nelle specie domestiche allevate. Questa correlazione è risultata significativa, nei ceppi isolati in allevamento, per amoxicillina, ceftiofur, enrofloxacin e tetraciclina. Sono diversi i fattori che contribuiscono alla presenza di fenomeni di antibiotico-resistenza tra le specie selvatiche in una determinata area geografica. Il più importante riguarda il grado di associazione con le attività umane. Gli habitat dove più frequentemente sono stati dimostrati fenomeni

di antibiotico-resistenza nelle specie selvatiche includono infatti attività zootecniche, discariche e impianti di depurazione delle acque. L'utilizzo della pollina come fertilizzante rappresenta un altro fattore di rischio. Da non sottovalutare infine il ruolo degli uccelli migratori nel veicolare e disseminare ceppi antibiotico-resistenti per lunghe distanze in un periodo di tempo relativamente breve.

BIBLIOGRAFIA

1. AAVV (2012). Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1683_allegato.PDF
2. AAVV (2015). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. EFSA journal 13:4006-4120.
3. Bonnedahl J., Hernandez J., Stedt J., Wladenstrom J., Olsen B., Drobní M. (2014). Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in gulls, Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases* 20:897-899.
4. Camarda A., Circella E., Pennelli D., Madio A., Bruni G., Lagrasta V., Marzano G., Mallia E., Campagnari E. (2006). Wild birds as biological indicators of environmental pollution: biotyping and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from Audouin's gulls (*Larus audouinii*) living in the Bay of Gallipoli (Italy). *Italian Journal of Animal Science* 5:287-290.
5. Cole D., Drum D.J., Stalknecht D.E., White D.G., Lee M.D., Ayers S. (2005). Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 11:935-938.
6. Costa D., Poeta P., Saenz Y., Vinue L., Coelho A.C., Matos M., Rojo Bezares B., Rodrigues J. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microbial drug resistance* 14:72-77.
7. Health Council of the Netherlands (2011). Antibiotic in food animal production and resistant bacteria in humans – n.2011/16 The Hague.
8. Regolamento CE n.37/2010 del 22 dicembre 2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale. GU L15 del 20.1.2010 pag.1.
9. Sato G., Oka C., Asagi M., Ishiguro N. (1978). Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 241:407-417.

Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della ricerca corrente IZSLER PRC2011/010 "ricerca e caratterizzazione di nuovi microorganismi appartenenti alla famiglia delle *Chlamydiaceae* e di *Escherichia coli* in allevamenti avicoli, avifauna selvatica e volatili d'affezione".

Tabella 1: riepilogo sensibilità antibiotica dei ceppi isolati da specie avicole allevate nell'intero periodo (2013-2014)

	PEN	AMX	ENR	CET	TLS	TET	TILM	NEO	LIS	T/S	OXA	COL	ERY	TIA	LIN	STR	RAM	SPT
n.ceppi RESISTENTI (%)	35 (100)	24 (68)	22 (62)	19 (54)	34 (97)	30 (84)	35 (100)	6 (16)	28 (81)	14 (38)	34 (97)	0	34 (97)	35 (100)	35 (100)	10 (30)	0	24 (69)
n.ceppi SENSIBILI (%)	0	11 (32)	13 (38)	16 (46)	1 (3)	5 (16)	0	29 (84)	7 (19)	21 (62)	1 (3)	35 (100)	1 (3)	0	0	25 (70)	35 (100)	11 (31)

Tabella 2: riepilogo sensibilità antibiotica dei ceppi isolati da specie avicole selvatiche nell'intero periodo (2013-2014)

	PEN	AMX	ENR	CET	TLS	TET	TILM	NEO	LIS	T/S	OXA	COL	ERY	TIA	LIN	STR	RAM	SPT
n.ceppi RESISTENTI (%)	50 (100)	11 (21)	6 (13)	8 (16)	50 (100)	15 (30)	50 (100)	3 (5)	35 (70)	6 (12)	50 (100)	0	50 (100)	50 (100)	50 (100)	4 (8)	0	32 (64)
n.ceppi SENSIBILI (%)	0	39 (79)	44 (88)	42 (84)	0	35 (70)	0	47 (95)	15 (30)	44 (88)	0	50 (100)	0	0	0	46 (92)	50 (100)	18 (36)

Tab.3: Correlazione tra la resistenza agli antibiotici dei ceppi isolati da fauna selvatica ed allevamento (Pvalue calcolato con test esatto di Fisher).

Antibiotico	Pvalue
PEN	1,00
AMX	<0,0001*
ENR	<0,0001*
CET	0,0003*
TLS	1,00
TET	<0,0001*
TILM	1,00
NEO	0,15
LIS	0,33
T/S	0,01
OXA	0,41
COL	1,00
ERY	0,41
TIA	1,00
LIN	1,00
STR	0,02
RAM	1,00
SPT	0,49

*Percentuali di resistenza associate in modo statisticamente significativo agli isolati da allevamento