

# **VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA AVIFAUNA STANZIALE E MIGRATORIA CATTURATA PRESSO L'ISOLA DELL'ASINARA.**

Grilli G., Zullo F., Ferrazzi V., Gallazzi D.

*Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET), Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, guido.grilli@unimi.it*

## **Summary**

Evaluation of the sensitivity to antibiotics of *Escherichia coli* strains isolated from local and migratory birds captured on the Island of Asinara.

The phenomenon of antimicrobial resistance in bacteria has long been known. Numerous studies have investigated this issue in humans and farm animals, while it is not yet clear how this manifests itself in wildlife. The purpose of our work was to monitor the antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from local and migratory birds captured on the Island of Asinara, a national park since 1991. This place was chosen because of the particular location of the island and the fact that there are no permanent human settlements or herds of animals. In total, in a ringing season, we captured 170 subjects belonging to 21 species of which 13 were migratory and 8 sedentary, for a total of 49 isolated strains of *E. coli*. These strains showed a resistance > 50% to quinolones, polymyxins, and tetracycline, 30% to sulfonamides, and less than 5% to fluoroquinolones and other classes of antibiotics. Strains resistant to third and fourth generation cephalosporins and to carbapenems are also noteworthy. Further investigation is needed to study the role of birds, especially migratory, in more detail in order to better understand the role they may have as a possible reservoir and diffuser of antimicrobial resistant strains.

## **INTRODUZIONE**

L'antibiotico resistenza di batteri patogeni e commensali di origine animale è uno dei più grandi problemi di sanità pubblica in tutto il mondo. Questa considerazione è così importante che l'Unione Europea, nell'emanare le varie direttive, ha considerato l'antibiotico resistenza una "zoonosi trasversale" così come espresso dalla Direttiva 2003/99/CE del 17 novembre 2003. In tale Direttiva, l'articolo 16 cita: "Si rende necessario sorvegliare la preoccupante insorgenza di casi di resistenza agli antibiotici (quali medicinali antimicrobici e additivi antimicrobici nei mangimi). Si dovrebbe disporre che la sorveglianza non riguardi soltanto agenti zoonotici ma anche, nella misura in cui presentano una minaccia per la sanità pubblica, altri agenti. Potrebbe rivelarsi opportuna in particolare la sorveglianza di organismi indicatori, i quali costituiscono una riserva di geni di resistenza che possono trasferire ai batteri patogeni." Sono numerosi gli studi che hanno indagato su tale argomento, nell'uomo e negli animali d'allevamento, mentre non è

ancora chiara come questa si manifesti negli animali selvatici. Infatti, nel caso della fauna selvatica, lo studio dell'antibiotico-resistenza non viene affrontato per stabilire migliori strategie di cura, bensì per valutare se ci sono tali caratteristiche e in quale entità. In particolar modo gli uccelli sono degli ottimi indicatori ambientali in quanto possono, nel loro migrare, acquisire batteri resistenti e distribuirli a seguito di contatto con attività antropiche e di allevamento. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di monitorare l'antibiotico resistenza di ceppi di *Escherichia coli* isolati da avifauna stanziale e migratoria catturata presso l'Isola dell'Asinara, parco nazionale dal 1991. La scelta di questo luogo è data dalla particolare ubicazione dell'isola e dal fatto che non esistano stabili insediamenti umani né allevamenti di animali.

## **MATERIALI E METODI**

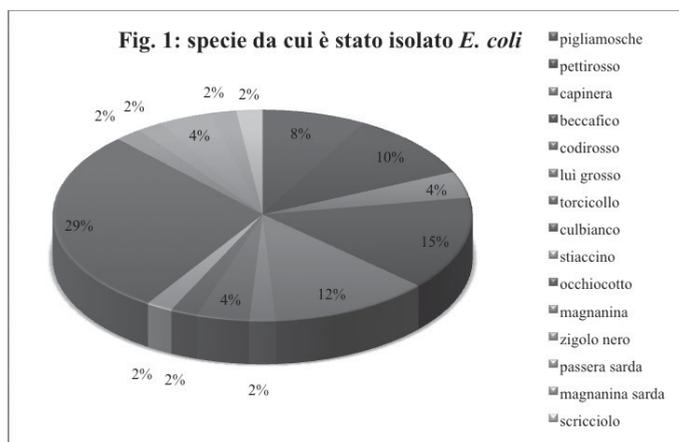
Il nostro lavoro si è svolto presso il Parco Nazionale dell'Asinara in Sardegna, durante l'attività di inanellamento scientifico autunnale che corrisponde ai mesi di settembre e ottobre. La cattura degli uccelli è avvenuta mediante l'uso di 8 reti Mist Nets, il controllo di tali reti veniva fatto ogni ora dalle 7 del mattino fino alle 22 di sera. Una volta prelevati gli uccelli imbrigliati nelle reti, questi venivano inseriti in appositi sacchetti di cotone e portati alla stazione di inanellamento dove ogni individuo veniva identificato per specie, sesso, età e ne venivano segnalati i dati biometrici. In ogni sacchetto di cotone, lavato e disinfettato, utilizzato per trasportare gli uccelli dalle reti alla stazione di inanellamento, era stato inserito un disco di carta da filtro in cui i soggetti potevano defecare e quindi si procedeva a ritagliare la parte imbrattata che veniva inserita in provetta e immediatamente refrigerata a temperatura di 4°C. I campioni sono stati poi trasportati presso il DIVET dove sono stati processati per la ricerca di enterobatteri al fine di isolare *Escherichia coli* e di valutarne quindi l'antibiotico resistenza. Il campione veniva immerso in Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Oxoid) e incubato per qualche ora a 37°C; successivamente il campione veniva seminato su terreno solido Chromogenic Urinary Tract Infection (UTI) (Oxoid) incubato a 37°C per 24 ore in aerobiosi. Le colonie che avevano un aspetto ascrivibile ad *E. coli* sono poi state ritrapiantate su TSA Agar e identificate con micrometodo RapID ONE System (Oxoid). I ceppi di *E. coli* così identificati sono stati sottoposti al test di sensibilità agli antimicrobici utilizzando la tecnica di Kirby-Bauer e confrontando i risultati ottenuti con gli standard di riferimento (EUCAST 2013) suddividendoli in resistenti, intermedi e sensibili. Gli antimicrobici testati sono stati i seguenti: Amoxicillina (AMX), Cefotaxime (CTX), Nalidixico (NA), Flumequina (UB), Ciprofloxacina (CIP), Enrofloxacin (ENR), Levofloxacina (LEV), Norfloxacina (NOR), Aminodisina (AM), Apramicina (APR), Gentamicina (CN), Neomicina (N), Streptomicina (S), Cloramfenicolo (C), Florfenicolo (FFC), Trimetoprim/sulfametossazolo (SXT), Trisulfamidico (S3), Doxiciclina (DO), Ossitetraciclina (OT), Colistina (CT), Polimixina B (PB), Lincom/spectinomycin (LS), Imipemen (IPM).

## **RISULTATI**

Nell'arco di due settimane, sono stati raccolti 170 campioni di feci da diverse specie di uccelli, 58 da specie stanziali e 112 da specie migratorie.

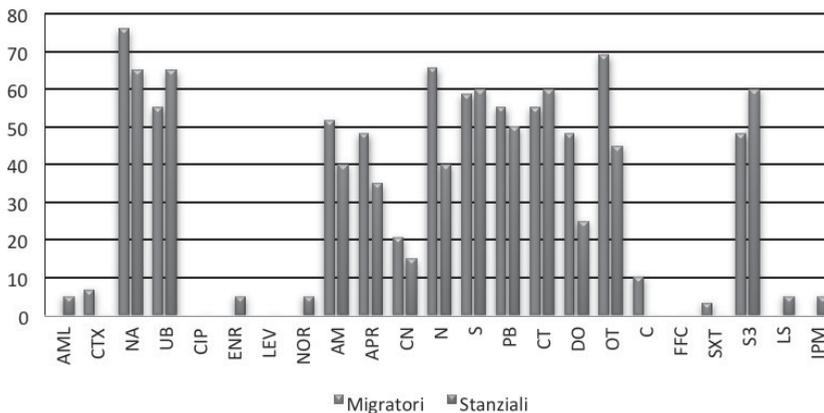
SPECIE	STANZIALE	MIGRATORIA	NUMERO CAMPIONI
Occhiocotto	x		46
Codirosso		x	26
Beccafico		x	25
Pettiroso		x	22
Capinera		x	16
Pigliamosche		x	7
Lui grosso		x	4
Passera sarda	x		3
Torricollo		x	3
Saltimpalo	x		2
Zigolo Nero	x		2
Balia nera		x	2
Magnanina	x		2
Stiaccino		x	2
Cannaiola		x	2
Tordo bottaccio		x	1
Tottavilla	x		1
Sterpazzola		x	1
Magnanina Sarda	x		1
Culbianco		x	1
Scricciolo	x		1
TOTALE	8	13	170

Da questi campioni sono isolati 49 ceppi di *E. coli*; di questi il 59% provenivano da specie migratrici e il restante 41% da specie stanziali (Fig. 1)



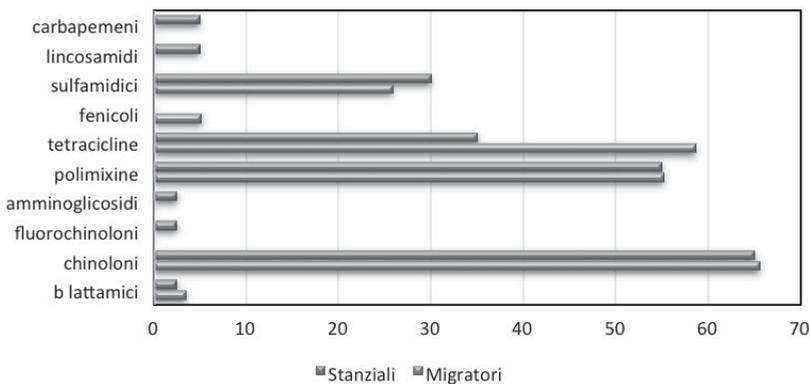
Tutti i 49 ceppi isolati sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità agli antibiotici, i risultati relativi alla resistenza, suddivisi tra gli isolati da specie migratrici e stanziali, sono riportati in Fig. 2

**Fig. 2: antibiotico resistenza di *E. coli*: confronto tra specie migratrici e stanziali**



Raggruppando i principi attivi all'interno delle famiglie chimiche, la media delle resistenze è riportata graficamente nella Fig. 3.

**Fig. 3: Resistenze medie alle varie classi di antimicrobico**



Si può notare come la resistenza registrata risulta essere elevata soprattutto nei riguardi della classe dei chinoloni, delle polimixine e delle tetracicline, per i sulfamidici la resistenza si attesta sul 30% dei ceppi mentre risulta inferiore al 5% nelle altre classi di antimicrobici. Si segnala comunque la presenza di alcuni ceppi resistenti a carbapemeni e a cefalosporine di terza generazione.

## **DISCUSSIONE**

La scelta di monitorare l'antibiotico resistenza è scaturita dall'allarmante continuo diffondersi della resistenza agli antibiotici, fenomeno di continua crescita, non solo in ospedali, ma anche in zone urbane e in ambienti totalmente naturali (Guerra *et al.*, 2014). Questo fenomeno in animali da reddito (bovini, pollame, conigli, ovini e caprini) è in parte spiegata con la storia pregressa dell'utilizzo continuo degli antimicrobici in terapia ed è probabilmente questo ad averne influenzato la presenza anche in animali selvatici venuti a contatto con tali realtà (Selfi *et al.*, 2012). Oltre agli animali da reddito, diversi Autori hanno indagato sulla presenza di antibiotico resistenza in batteri fecali, specialmente *E. coli*, isolati da specie di mammiferi selvatici, spesso catturati nelle vicinanze di allevamenti o zone urbane (Guenther *et al.*, 2012) o corsi d'acqua (Servais e Passerat, 2009), dimostrando che le specie selvatiche, una volta acquisiti ceppi resistenti, hanno un ruolo importante anche nella loro diffusione nell'ambiente (Gilliver *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2008; Carattoli, 2008). Negli ultimi anni si riscontra un maggiore interesse inerente gli animali selvatici per capire meglio sia l'origine dell'antibiotico resistenza registrata nella fauna sia la sua diffusione inter e intraspecifica. A tale riguardo si ricorda che tale fenomeno è stato ritrovato anche in zone assolutamente remote e ben lontane da qualsiasi tipo di contatto umano (Smith *et al.*, 2014). L'avifauna migratoria, grazie alla sua maggiore mobilità, ha più probabilità di avere contatti con ceppi resistenti agli antibiotici presenti negli ambienti in cui vivono animali domestici (pascoli o stalle) o dove vi è maggiore contaminazione fecale, anche umana (distribuzione di liquami o letame). Vi è la possibilità che, una volta acquisiti questi ceppi, le specie migratrici facciano da vettore nei vari ambienti di sosta contaminandoli. Potrebbe essere quindi, che i risultati da noi ottenuti siano dovuti al contatto tra uccelli migratori e stanziali presso l'isola dell'Asinara, non sembra infatti esserci differenza tra ceppi isolati da specie stanziali e migratorie. In questo contesto è da tener presente che non vi è insediamento umano né allevamenti, per cui è molto bassa la possibilità che si verifichino contatti tra la fauna del luogo e animali domestici, il ritrovamento però di alcuni ceppi resistenti alle cefalosporine e ai carbapemeni fa pensare di più a ceppi di origine umana. Anche Santos *et al.*, recentemente (2013), hanno svolto degli studi in realtà del tutto isolate sia da centri urbani che da allevamenti, come nel caso dell'arcipelago delle Azzorre. Anche una ricerca eseguita sugli uccelli artici ha dimostrato la presenza di batteri multi resistenti agli antibiotici, indicando come la migrazione sia in parte responsabile del trasferimento dell'antibiotico resistenza in aree remote e lontane da centri urbani (Benskin *et al.*, 2009)

## **CONCLUSIONI**

La causa della resistenza agli antibiotici risiede in molteplici attività antropiche oltre che essere legata a specifiche caratteristiche intrinseche di alcune specie batteriche. Con il nostro lavoro, malgrado il limite del campionamento, ho potuto constatare come l'avifauna, sia migratoria che stanziale, possa ospitare ceppi antibiotico resistenti e fungere

effettivamente da diffusore come sostengono Santos *et al.*, (2013).

L'uso dell'antibiotico per la società odierna è essenziale per il trattamento di malattie infettive e non è possibile farne a meno, ma sarebbe sicuramente utile uno studio più approfondito e non saltuario dei serbatoi ambientali di resistenza (Radhouani *et al.*, 2013). Non è sufficiente tamponare il problema, minimizzandone l'entità, ma è necessario combatterne la causa: in base ai risultati emersi anche dalle nostre osservazioni, si può affermare che l'interazione animale domestico-selvatico-uomo è il punto focale su cui concentrare le indagini e il monitoraggio di tale fenomeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Benskin C., Wilson K., Hartley I., Harley K. (2009) Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection". Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol. Rev.*, 84: 349–373,
2. Carattoli A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microbiol Infect*, 14: 117–23,
3. Costa D, Poeta P, Saenz Y, Vinue L, Coelho AC, Matos M. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microb Drug Resist*, 14:71–7,
4. Gilliver M.A., Bennett M, Begon M, Hazel SM, Hart CA. (1999). Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*; 401:233–4,
5. Guenther S., Bethe A., Fruth A., Semmler T., Ulrich R.G. (2012). Frequent Combination of Antimicrobial Multiresistance and Extraintestinal Pathogenicity in *Escherichia coli* Isolates from Urban Rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *PLoS ONE* 7(11) 29:1902–1908,
6. Guerra B., Fischer J., Helmuth R. (2014). An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology*, 171: 290–297.
7. Radhouani H., Igrejas G., Gonçalves A., Pacheco R., Monteiro R., Sargo R., Brito F., Torres f C., Poeta P. (2013). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and Enterococci from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Anaerobe*, 23 : 82-86
8. Santos T., Silva N., Igrejas G., Rodrigues P., Micael J., Rodrigues T., Resendes R., Gonçalves A., Marinho C. , Gonçalves D., Cunha R., Poeta P. (2013) Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe* 24: 25-31,
9. Seifi. S, Shirzard, M. R. (2013). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from free range poultry or wild birds at the southern Caspian Sea coast of Iran. *Web of Science*, 64: 249-254,
10. Servais P., Passerat J.: (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment* 408 365–372
11. Smith S., Wang J., Funning S., McMahon B. J. (2014). Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: a coincidence or cause for concern?. *Irish Veterinary Journal*, 67:8.