

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FILOGENETICA DI *ESCHERICHIA COLI* ESBL-PRODUTTORI ISOLATI DA POLLO

Brunetta R., Zandonà L., Bano L., Drigo I., Mazzolini E., Andreatta S., Catania S., Cocchi M., D'Este L., Pozzato N., Trevisiol K., Agnoletti F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

Summary

The aim of this study was to investigate the molecular characteristics of 384 extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from 243 poultry farms located in Northeastern Italy. Most of bacterial isolates (73%) originated from meat chicken flocks and 23% from layer hens flocks and 4% from meat chicken breeder flocks. Bacterial strains were classified in seven different phylogroups (from A to F), but the most represented were the phylogenetic groups A and B1, which are typically environmental and commensal strains. The *mcr-1* gene was detected in the 4.7% tested strains. Thirty-three isolates were classified in 22 different sequence types (ST). One ST131 isolate belonging to phylogroup B2 and carrying the *mcr-1* gene is to be considered of zoonotic potential among the avian ESBL-producing *E. coli*.

INTRODUZIONE

È ormai universalmente accettata l'idea che per risolvere o contenere il problema delle resistenza batterica agli antimicrobici sia necessario un approccio One-Health. Quest'ultimo considera uomo, animale e ambiente parte dello stesso sistema e studia le loro interazioni per una miglior comprensione di questo fenomeno biologico. Fra i batteri multiresistenti (MDRO) di maggior rilevanza per la salute umana il WHO (2017) elenca *Escherichia (E.) coli* in grado di produrre β -lattamasi a spettro esteso (ESBL). Questi enzimi conferiscono resistenza agli antibiotici β -lattamici, incluse le cefalosporine di III e IV generazione, e rappresentano una seria minaccia d'insuccesso terapeutico nei confronti di importanti infezioni umane sostenute da batteri Gram-negativi, comunemente trattate con cefalosporine (Chong et al., 2011). Alcuni studi documentano la possibilità che *E. coli* ESBL-produttori vengano trasmessi dagli animali, e in particolare dal pollame, all'uomo (Dierikx et al., 2013; Dahmas et al., 2015), ma esistono poche informazioni al riguardo in Italia.

La diffusione di MDRO Gram-negativi giustifica la recente rivalutazione terapeutica della colistina, considerata dal WHO (2016) farmaco di importanza critica per la cura delle infezioni umane sostenute da enterobatteri ESBL-produttori. Desta quindi particolare preoccupazione la descrizione del gene di resistenza alla colistina *mcr-1* (Liu et al. 2016), localizzato a livello plasmidico, recentemente segnalato in animali e uomo unitamente alle sue numerose varianti (Wise et al. 2018).

Per valutare la trasmissibilità di *E. coli* da animali all'uomo è necessario utilizzare metodi che consentono di caratterizzare gli isolati batterici ottenuti dalle diverse specie e di confrontarne l'omologia genetica. Fra questi risultano di particolare interesse la determinazione del gruppo filogenetico (Clermont et al., 2013) e il multilocus sequence typing (MLST) (Wirth et al., 2006).

Il primo è utile nell'accomunare ceppi che occupano determinate nicchie ecologiche o che si sono resi responsabili di patologie nell'uomo e negli animali; ad esempio, i gruppi filogenetici B2 e D sono stati associati a malattie che colpiscono l'uomo e il pollo mentre i gruppi A e B1 raggruppano ceppi ritenuti commensali o ambientali (Olsen et al., 2014). Il secondo consente la classificazione degli isolati batterici analizzati in sequence type (ST) che raggruppano ceppi geneticamente correlati. L'MLST si è dimostrato metodo d'elezione per studiare la diffusione di enterobatteriacee dotate di elevate resistenze agli antimicrobici (Woodford et al., 2011).

Scopo di questo lavoro era valutare la possibilità che allevamenti di pollame situati nel Triveneto possano fungere da reservoir di MDR *E. coli* potenzialmente trasmissibili al personale a contatto con gli animali ed al consumatore, valutando le caratteristiche genetiche degli isolati e comparandole con quelle dei cloni responsabili di patologia nell'uomo. A questo scopo sono stati utilizzati campioni conferiti alle sezioni diagnostiche dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) nell'ambito delle normali attività diagnostiche e di controllo, successivamente arruolati per la ricerca di *E. coli* ESBL-produttori. Gli isolati batterici collezionati nel corso della ricerca, condotta nel periodo 2016-2017, sono stati genotipizzati e sono stati determinati i loro pattern di resistenza nei confronti di un pannello di antimicrobici rilevanti per la terapia delle infezioni umane sostenute da batteri Gram-negativi. Infine si è voluta indagare la presenza dei geni di resistenza alla colistina *mcr-1* ed *mcr-2*, anch'essi di rilevante interesse per la sanità pubblica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Per la ricerca di *E. coli* ESBL-produttori sono stati utilizzati campioni fecali e contenuti intestinali di pollo (broiler e ovaiole) conferiti alle sezioni diagnostiche di IZSVE nel periodo 2016-2017.

L'arruolamento dei campioni è avvenuto impiegando uno strumento informatico (*sample enrolment tool*: SET) che scansionava giornalmente le accettazioni delle sezioni diagnostiche di IZSVE. Per evitare l'overclustering era possibile prelevare campioni in un allevamento già arruolato nello studio, e identificato mediante il codice 317, solo dopo quattro mesi da un precedente campionamento, garantendo in tal modo l'arruolamento di un gruppo di animali diverso per gli allevamenti di polli da carne.

Ogni campione era rappresentato da animali dello stesso gruppo e quando il campione era rappresentato da più animali si procedeva alla preparazione di un pool di feci o contenuti intestinali; la positività o negatività del campione era quindi riferita al gruppo conferito al laboratorio e non ai singoli individui. Da ogni campione veniva selezionato in modo casuale un solo isolato *E. coli* ESBL-produttore per le successive analisi di laboratorio.

Esame batteriologico e caratterizzazione fenotipica dei ceppi di E. coli produttori di β-lattamasi

I campioni sono stati sottoposti ad arricchimento selettivo in *Brain heart infusion* broth addizionato con cefotaxime incubato a 37±1 °C per 18-24 ore. Al termine del

periodo d'incubazione 10 μ L di brodocoltura venivano distribuiti per spatolamento sulla superficie di terreno *McConkey agar* addizionato con cefotaxime (McCC). In caso di crescita di colonie morfologicamente riconducibili ad *E. coli* si procedeva alla loro identificazione tramite MALDI-TOF (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) e ad un test di conferma mediante diffusione in agar utilizzando dischetti impregnati con i seguenti principi attivi: cefotaxime con e senza acido clavulanico, ceftazidime con e senza acido clavulanico, cefoxitina, cefepime e meropenem. I risultati venivano interpretati secondo gli algoritmi EUCAST che consentono di distinguere la resistenza ai β -lattamici di tipo ESBL o AmpC e di individuare ceppi resistenti ai carbapenemi (EUCAST, 2013).

Genotipizzazione degli isolati batterici

I ceppi di *E. coli* ESBL-produttori sono stati ulteriormente analizzati per la determinazione del gruppo filogenetico (Clermont et al. 2013) e una selezione di isolati batterici afferenti ai diversi gruppi filogenetici è stata indagata mediante MLST (Wirth et al. 2006). Per la determinazione del tipo di ESBL ed AmpC sono stati ricercati i geni TEM, CTX-M, CMY ed SHV e le loro varianti (Woodford et al. 2005; Dierikx et al. 2010). Infine in tutti i ceppi sono stati ricercati mediante PCR i geni di resistenza alla colistina a localizzazione plasmidica *mcr-1* (Liu et al., 2016) ed *mcr-2* (Xavier et al., 2016).

Test di farmacosenibilità

Per valutare la sensibilità agli antimicrobici dei ceppi di *E. coli* ESBL-produttori collezionati nel corso dello studio è stata determinata la minima concentrazione inibente nei confronti di un pannello di principi attivi di interesse in sanità pubblica umana. A questo scopo è stato utilizzato il metodo della microdiluzione in brodo (CLSI, 2015) impiegando un kit commerciale miniaturizzato (Sensititre ITGNEGF, Thermo-Fisher, TREK Diagnostic Systems) comprendente 18 principi attivi. Considerando le finalità del lavoro, che volevano evidenziare eventuali rischi di trasmissione di batteri multiresistenti dal pollame all'uomo, le MIC sono state interpretate utilizzando i breakpoint clinici umani (EUCAST, 2018). Ceppi con valori di MIC di imipenem, ertapenem e meropenem superiori al breakpoint di sensibilità clinica sono stati ulteriormente controllati per la conferma di resistenza ai carbapenemi utilizzando specifici test di diffusione in agar mediante dischetto (KPC/Metallo-B-Lactamase e OXA-48 Confirm Kit ROSCO, Taastrup, Denmark).

RISULTATI

Nel corso dello studio sono stati esaminati complessivamente 384 gruppi di animali: 195 di broiler, 174 di ovaiole e 15 di riproduttori, provenienti da 243 allevamenti dislocati in Veneto (125 allevamenti), Friuli Venezia Giulia (40 allevamenti) e nelle province autonome di Trento e Bolzano (rispettivamente 5 e 73 allevamenti). I campioni risultati positivi per *E. coli* ESBL-produttori sono stati 191/384 (49,7%). Di questi 143/195 (73,3%) erano stati isolati da broiler, 40/174 (22,9%) da ovaiole, 8/15 (53,3%) da riproduttori. I campioni positivi per β -lattamasi di tipo AmpC sono stati 77/384 (20%).

I gruppi filogenetici più rappresentati sono risultati l'A (52/191) e il B1 (52/191),

seguiti poi dall’F (21/191), dal C (20/191), dall’E (16/191), dal B2 (14/191) e dal D (10/191). Per 6 ceppi non è stato possibile determinare il gruppo filogenetico.

Tra i 191 ceppi di *E. coli* ESBL-produttori, 105 sono risultati positivi al gene CTX-M (100/105 di gruppo 1 e 5/105 di gruppo 9), 79 a TEM (unicamente TEM-1), 34 a SHV (tutte varianti 12), 55 a CMY il cui sequenziamento non ha permesso di discriminare tra le varianti 2, 22 e 61. Tre ceppi sono risultati negativi per tutti i geni di resistenza indagati.

In 78 isolati erano simultaneamente presenti più tipi di ESBL o AmpC. Le associazioni più comuni erano le seguenti: CTX-M-1 + TEM-1 in 41/191 isolati, CMY-2/22/61+ TEM-1 in 18/191 isolati, SHV-12 + TEM-1 in 113/191 isolati, CMY-2/22/61 + TEM-1 + CTX-M-1 in 3/191 isolati, CTX-M-1 + SHV-12 + TEM-1 in 2/191 isolati e TEM-1 + SHV-12 + CMY-2/22/61 osservata in un unico ceppo batterico. I ceppi portatori del gene *mcr-1* sono stati 9/191 (4,7%) mentre non è stato individuato in alcun isolato con presenza di *mcr-2*.

Utilizzando il gruppo filogenetico come criterio di selezione sono stati sottoposti a MLST 33 isolati batterici che sono risultati appartenere a 22 differenti ST. Tra questi 8 ceppi appartenevano a ST 429 e 2 ceppi a ciascuno dei seguenti: ST57, ST131, ST136, ST410 e ST2040. Tutti gli altri ST sono stati individuati in singoli isolati batterici.

I risultati dei test di farmacosenibilità vengono riportati in tabella 1.

DISCUSSIONE

Il presente studio intendeva descrivere la variabilità molecolare di *E. coli* ESBL-produttori isolati da allevamenti di pollame del Triveneto, e non stimarne la prevalenza, che avrebbe richiesto un diverso disegno di studio. Allo scopo sono stati utilizzati sia animali sani che malati e metodi di arricchimento selettivo per aumentare la sensibilità dell’esame batteriologico.

Quasi la metà dei gruppi di pollame selezionati e conferiti ai laboratori IZSve per scopi diagnostici o di sorveglianza permetteva l’isolamento di *E. coli* ESBL produttori e garantiva la variabilità molecolare della collezione di isolati. Questo risultato è tuttavia consistente con quanto descritto in Olanda da Dierikx (2012), che, utilizzando l’arricchimento selettivo per individuare *E. coli* ESBL-produttori, aveva trovato che il 100% degli allevamenti analizzati era risultato positivo, con prevalenze intra-aziendali anche superiori all’80%.

Sebbene la numerosità campionaria sia stata molto differente per le 3 tipologie produttive indagate (broiler, ovaiole e riproduttori), non consentendo valutazioni di tipo statistico e, tantomeno, stima di prevalenza, si è osservata una maggior percentuale di gruppi positivi per *E. coli* ESBL-produttori fra i polli da carne rispetto alle altre categorie (ovaiole e riproduttori).

Nel campione di isolati si è rilevata una notevole eterogeneità molecolare, infatti sono stati individuati tutti i gruppi filogenetici descritti in *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E ed F), sia pure con una predominanza dei gruppi A e B1; questi risultati sono allineati con quanto già osservato da Daehere (2018) nel pollame e da Eisenberger (2018) in vacche da latte. Sono risultati sporadici (14/191) gli isolati batterici appartenenti al gruppo filogenetico B2, responsabili di patologia nell’uomo (Olsen et al., 2014).

La ricerca dei geni di resistenza alla colistina ha permesso di individuare 9/191

(4,7%) *E. coli* ESBL-produttori portatori del gene *mcr-1*, fra i quali un isolato appartenente al gruppo filogenetico B2 e al ST131, clone considerato di successo e pandemico a livello mondiale, responsabile di gravi infezioni delle vie urinarie (UTI) nell'uomo. Al contrario, non sono stati individuati *E. coli* portatori del gene *mcr-2*, in accordo con quanto riportato in precedenti studi condotti nel pollame (Barbieri et al., 2017). Per quanto riguarda la resistenza agli antimicrobici nessuno dei 187 ceppi esaminati è risultato resistente ai carbapenemi e alla tigeciclina, farmaci critici per la salute umana, mentre è risultata elevata (43,3%) la percentuale di ceppi resistenti alla ciprofloxacina.

CONCLUSIONI

Il nostro lavoro ha evidenziato la presenza di un'ampia varietà di geni di resistenza di tipo ESBL o AmpC, e delle loro varianti, diversamente associati fra loro, in *E. coli* ESBL-produttori isolati da habitat intestinale di polli allevati intensivamente nel Triveneto. L'identificazione del clone pandemico ST131, fenotipicamente resistente alla colistina e portatore del gene a localizzazione plasmidica *mcr-1*, merita attenzione per il suo potenziale significato zoonosico.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato finanziato dal Ministero della Salute nell'ambito del progetto CCM2015 "Il modello One-Health per il contenimento delle resistenze microbiche di possibile origine zoonosica in sanità pubblica: sviluppo di un network medico-veterinario applicato alla prevenzione e controllo della circolazione di *Escherichia coli* produttore di ESBL, 2015-2018" e della ricerca corrente 12/14 IZSVE.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbieri, N.L., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S., Nolan, L.K., Logue, C.M., 2017. *Mcr-1* identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PloS ONE* 12 (3) e0172997.
2. Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G., 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 413-431.
3. Chong, Y., Ito, Y., Kamimura, T., 2011. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 1499-1504.
4. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports* 5, 58-65.
5. CLSI, M07-A10, 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-tenth edition
6. Daehre K., Projahn M., Semmler T., Roesler U., Friese A., 2018. Extended-spectrum Beta Lactamase-/AmpC Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in broiler farms: Transmission dynamics at farm level; *Microbial Drug Resistance* 24 (2018) pp 511-518
7. Dahms, C., Hübner N.O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K., Kramer,

- A., 2015. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. PLoS ONE 10(11): e0143326.
8. Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., Mevius, D., 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. Vet. Microbiol. 145, 273-278.
 9. Dierikx C., van der Goot J., Fabri T., van Essen-Zandbergen A., Smith H., Mevius D., 2013. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68, 60-67
 10. Eisemberg D., Carl A., Balsliemke J., Kampf P., Nickel S., Schulze G., Valenza G., 2018. Molecular characterization of extended spectrum betalattamase producing *Escherichia coli* isolates from milk samples of dairy cows with mastitis in Bavaria, Germany. Microbial Drug Resistance, 24(4):505-510.
 11. EUCAST. 2013. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf
 12. EUCAST. 2018. Clinical breakpoints. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
 13. Liu, Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. The Lancet Infectious Diseases 16, 161-168.
 14. Niero G., Bortolaia V., Vanni M., Intorre L., Guardabassi L., Piccirillo A., 2018. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry in Italy. Vet Microbiol 93-98.
 15. Olsen, R.H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B., Christensen, H., 2014. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. Avian Pathol. 43, 199-208.
 16. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol 60, 1136-1151.
 17. Wise, M.G., Estabrook, M.A., Sahn, D.F., Stone, G.G., Kazmierczak, K.M., 2018. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. PloS ONE 13(4) e0195281.
 18. Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M., 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Rev. 35, 736-755.
 19. Woodford, N., Fagan, E.J., Ellington, M.J., 2005. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother 57, 154-155.
 20. World Health Organization (WHO), 2016. Critically important antimicrobials

- for human medicine. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/cia/en/
21. World Health Organization (WHO), 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
 22. Xavier, S., Lammers, C., Ruhhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malthotra-Kumar, S., Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 7; 21 (27)

Principio attivo	<0,064	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	%R
Amikacina						182		4			1			0,5
Gentamicina			138			9	4	36						21,4
Doripenem			187											0
Imipenem			186			1								0,5
Ertapenem			186			1								0,5
Meropenem		186			1									0,0
Cefotaxime					1		20	166						99,5
Cefepime			77			5	8	19	27	26	25			58,8
Ceftazidime					2	16	39	14	23	59	25	6	3	90,4
Colistina				160		7	7	5	4	4				7
Ciprofloxacina	70		14	22	13	4	4	60						43,3
Levofloxacina					123		2	14	48					35,3
Piperacillina/ tazobactam					134		32	18		3				1,6
Amoxicillina/ ac. clavulanico					6		20	55	106					56,7
Trimetoprim/ sulfamethoxazolo			101		5	3	6	72						41,7
Tigeciclina		128		50	7	2								0
Nitrofurantoina									179		5	3		1,6
Fosfomicina								175		5	3	4		3,7

Tabella 1. Risultati dei test di farmacossensibilità ottenuti attraverso la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) espressa in µg/mL. Le linee in neretto indicano i breakpoint clinici umani indicati da EUCAST.