

INDAGINE SU STAPHYLOCOCCI METICILLINO-RESISTENTI ED ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI ESBL IN UN ALLEVAMENTO INTENSIVO DI BROILER DEL NORD-OVEST ITALIA

Bonvegna M.¹, Dellepiane L.¹, Stella M.C.¹, Tomassone L.¹, Nebbia P.¹, Piovano F.², Mannelli A.¹

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Largo P. Braccini 2, 10095, Grugliasco (Torino), Italia;

²Servizio veterinario ASL Alessandria, 15121, Via Venezia 6, Alessandria, Italia;

Summary

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum β -lactamases-producing *E. coli* (ESBL-*E. coli*) are a threat to public health. Apart from methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), also MRS are gaining attention, especially for the potentiality of the transmission of the *mecA* gene to more pathogenic species, such as *S. aureus*. In this study we investigated MRS and ESBL-*E. coli* colonisation in broilers (90 animals) and farm environment (18 samples) from a North-western Italian farm, throughout the production cycle (time 0, 5 and 27 days). Phenotypic results on MRS in animals indicated a prevalence ranging from 0% at time zero, to 73.3% at 27 days. For ESBL-*E. coli*, the highest prevalence was registered at 5 days (23.3%), and, decreased at 27 days (3.3%). ESBL-*E. coli* in the environment were recovered only in one sample at 5 days, while MRS were always detected (67% at time 0, 100% at 5 and 27 days). All the MRS positive samples carried *mecA* gene; *Staphylococcus sciuri* was the most common bacteria identified. No MRSA was detected. ESBL-*E. coli* carried *bla*_{CTX-M} gene in 3 out of 8 positive animals' samples and in one environmental sample. The recovery of MRS and ESBL-*E. coli* in broilers and farm environment may be relevant especially for farm workers, that can be at risk of acquiring these bacteria from strict contact with animals and farm environment.

INTRODUZIONE

L'antimicrobico-resistenza (AMR) è ad oggi uno dei più importanti problemi sanitari, per l'uomo, l'ambiente e gli animali, soprattutto d'allevamento [1]. Secondo la letteratura, i broiler italiani presentano un'alta percentuale di colonizzazione da *Escherichia coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL-*E. coli*) (86%) [2]. Ad oggi pochi studi hanno invece documentato la presenza di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) nei polli [3,4,5], e ancor meno sono le ricerche che hanno indagato la presenza di altri staphylococchi meticillino-resistenti (MRS). Fra questi, gli staphylococchi coagulasi negativi (CoNS) sono considerati normali commensali delle narici e della cute degli avicoli [6,7], ma stanno gradualmente diventando sempre più importanti dal punto di vista clinico, nella patologia aviaria e umana. Oltretutto, rappresentano un problema di salute pubblica poiché possono essere reservoir del gene *mecA* (responsabile della meticillino-resistenza), per specie più patogene, quali *S. aureus* [8,9]. Obiettivo di questo studio è quello di indagare la presenza di MRS e ESBL-*E. coli* in broiler sani e nel loro ambiente, in un allevamento del Sud-est piemontese, in momenti diversi del ciclo produttivo (tempo 0, 5, e 27 giorni).

MATERIALI E METODI

I campioni sono stati prelevati in un allevamento intensivo di broiler nel sud-est del Piemonte, tra gennaio e marzo 2019. Sono stati effettuati in totale tre campionamenti a 0, 5 e 27 giorni del ciclo d'ingrasso. Ogni campionamento prevedeva il recupero di 30 tamponi fecali animali per ESBL-*E. coli*, 30 cutanei per MRS, e 3 tamponi ambientali per i rispettivi due gruppi batterici. In totale sono stati campionati 90 animali, sia per MRS che per ESBL-*E. coli*, mentre sono stati prelevati 9 campioni ambientali per MRS e 9 campioni per ESBL-*E. coli*. Le analisi di laboratorio per isolare i due gruppi batterici prevedevano una prima fase di arricchimento in acqua peptonata dei tamponi fecali e ambientali per ESBL-*E. coli*. Il brodo di soia triptico, con aggiunta di sale al 2.5% e gli antibiotici cefoxitina (3.5 mg/L) e aztreonam (20 mg/L), è stato invece utilizzato per la ricerca di MRS in tamponi cutanei, prelevati dall'area ascellare, e in quelli ambientali. Terreni selettivi sono stati impiegati nella seconda fase di isolamento; in particolare, per ESBL-*E. coli*, MacConkey 3 (MCC3) (Oxoid) con cefotaxime (1 mg/L), mentre per isolare le colonie di MRS, l'antibiotico cefoxitina (3.5 mg/L) è stato aggiunto a un Mannitol Salt Agar (MSA) modificato, con 6% di sale. Le piastre sono state incubate in termostato per 24 ore a 37°C. Per MRS, le colonie selezionate per ulteriori esami erano quelle risultate di colore giallo limone e di forma arrotondata sul terreno MSA modificato, mentre per ESBL-*E. coli* le colonie considerate positive erano quelle di colore rosso/viola, con alone rosato attorno e dalla forma arrotondata [10]. Per confermare la presenza di ESBL-*E. coli*, i campioni cresciuti su MCC3 sono stati seminati su Mueller Hinton con l'aggiunta di dischetti antibiotati "cefpodoxime combination disk test" (Oxoid). Dopo la caratterizzazione fenotipica, i campioni sono stati sottoposti ad analisi genotipica. Il DNA è stato estratto da colonie fresche e stoccato a -20°C. I presunti MRS sono stati sottoposti ad una PCR specifica per MRSA (*nuc*, *mecA* e *16s*), e per *mecA* [11]. Il sequenziamento del gene 16S r-DNA è stato usato per l'identificazione batterica. I campioni positivi alla ricerca fenotipica di ESBL-*E. coli*, sono testati con tre singole PCR per la ricerca dei geni *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}, come descritto in precedenza [12].

RISULTATI

Abbiamo rilevato una prevalenza di MRS sulla cute dei broiler pari al 43.3% (IC95%: 32.9-54.2), con valori che vanno dallo 0% all'arrivo dei pulcini in allevamento, a 56.7% a 5 giorni e 73.3% a 27 giorni del ciclo produttivo. A livello ambientale, MRS sono stati ritrovati in 8 campioni su 9 (88.8%); tutti i campioni ambientali prelevati a 5 e 27 giorni erano positivi. La presenza del gene *mecA* è stata confermata in tutte le colonie presunte MRS. Il gene *nuc*, specifico per *S. aureus*, non è stato isolato da nessuno dei campioni testati.

La percentuale di *E. coli* produttori di ESBL individuati fenotipicamente nei campioni fecali è 0% a tempo zero, 23.3% (7 su 30 campioni) a 5 giorni e 3.3% (1 su 30 campioni) a 27 giorni, mentre al livello ambientale i campioni positivi sono stati il 33.3% (1 su 3) a 5 giorni e 0% a tempo 0 e a 27 giorni. Le analisi biomolecolari hanno messo in evidenza la presenza del gene *bla*_{CTX-M} in 3 campioni animali (2 a 5 giorni, 1 a 27 giorni) su 8, e in 1 campione ambientale. In nessun campione sono stati rilevati i geni *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}.

Tutti i MRS rilevati negli animali sono staphylococchi coagulasi negativi meticillino-resistenti (MRCoNS) appartenenti alla specie *Staphylococcus lentus*, tranne un unico *S. sciuri*. Al livello ambientale è stato identificato solo *S. lentus*.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti evidenziano che la resistenza a MRS nei campioni animali cresce nel tempo, passando dallo 0% a tempo 0 (giorno in cui i pulcini entrano in allevamento), al 73.3% a 27 giorni, che rappresenta più della metà del ciclo produttivo di un broiler. Anche a livello ambientale i campioni positivi aumentano durante il ciclo produttivo, ma già a tempo zero abbiamo evidenziato MRS in 2 campioni su 3; ciò suggerisce che probabilmente l'ambiente rappresenta l'origine di infezione per gli animali neo-arrivati. Una situazione diversa è stata osservata per ESBL-*E. coli*, assente a tempo 0 sia negli animali che nell'ambiente. Ciò potrebbe indicare che la carica batterica degli ESBL-*E. coli* viene effettivamente azzerata dall'igienizzazione che viene fatta durante il periodo di vuoto tra un ciclo e l'altro. La prevalenza più alta di ESBL-*E. coli* negli animali è stata osservata a 5 giorni (23.3%), dato più basso rispetto all'86% riscontrato nel campionamento nazionale [2] e ad altri Paesi europei come la Germania, dove la percentuale di campioni positivi cecali era del 72.5% [13]. La presenza di *E. coli* produttori di ESBL più alta durante la prima fase del ciclo produttivo può essere dovuta al fatto che tali ceppi si trovano già nell'animale nella fase dell'incubatoio. È stato infatti dimostrata la loro presenza nel seme di broiler riproduttori [14]. Un'altra causa potrebbe essere l'uso di cefalosporine di terza generazione (ceftiofur) nell'incubatoio [15]. Il fatto che sia stato identificato solo *bla*_{CTX-M} come gene di resistenza è in accordo con la letteratura, dove risulta essere tra gli ESBL più frequentemente isolati in *E. coli* in animali di allevamento, tra cui i broiler [16,17].

Per quanto riguarda gli staphylococchi isolati in questo studio, essi vengono considerati commensali. Nonostante siano sempre stati considerati innocui, possono manifestare patogenicità in particolari occasioni. Infatti, alcuni di essi come *S. sciuri*, *S. simulans*, e *S. epidermidis* sono stati isolati da dermatiti, tendiniti ed endocarditi negli avicoli [8]. Inoltre, in uno studio è stata trovata una prevalenza del 12.5% di *S. sciuri* meticillino-resistenti in 200 broiler testati in 10 fattorie del Belgio [18], una percentuale più bassa rispetto al 30% riscontrato in un altro studio sempre dallo stesso autore [19]. In un altro studio, il 48.6% di 72 animali campionati in 72 allevamenti svizzeri erano positivi alla ricerca di MRCoNS [6]. Tali studi indicano che i MRCoNS sono tutt'altro che rari nell'allevamento dei polli da carne e dovrebbero pertanto essere tenuti sotto controllo. Oltretutto, i MRCoNS rappresentano un problema di salute pubblica in quanto sono probabili reservoir del gene *mecA*, che può essere trasmesso orizzontalmente al più patogeno *S. aureus* [20]. Pertanto, è sicuramente utile indagare lo stato di meticillino resistenza nei CoNS isolati dai polli per capire se questi ultimi possono fungere da vettori di *mecA* per MRSA.

CONCLUSIONI

Nonostante lo studio tratti di un solo allevamento broiler, ad oggi questo è l'unico che abbia evidenziato la contemporanea presenza di ESBL-*E. coli* e MRS nell'allevamento dei polli da carne nel nord Italia. Risulta perciò necessario continuare l'approfondimento microbiologico in altri allevamenti avicoli italiani, per comprendere se è un fenomeno isolato o è invece diffuso a livello nazionale. Questa indagine contribuisce inoltre, alla valutazione del rischio microbiologico a cui sono sottoposti i lavoratori nell'allevamento dei broiler, poiché evidenzia la presenza di ESBL-*E. coli* nei primi giorni di vita del broiler e osserva una contaminazione da MRS sia in ambiente che negli animali in quasi tutte le fasi d'ingrasso.

BIBLIOGRAFIA

1. FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. <http://www.fao.org/fsnforum/resources/fsn-resources/fao-action-plan-antimicrobial-resistance-2016-2020>
2. EUSR on AMR in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2014. *EFSA Journal* 2016; 14(2):4380.
3. Persoons D, Van Hoorebeke S, Hermans K, (2009) et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. *Emerg Infect Dis.*;15(3):452-453. doi:10.3201/eid1503.080696
4. Verhegghé M, Pletinckx LJ, Crombé F, et al. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in pig farms and multispecies farms. *Zoonoses Public Health.*; 60(5):366-374. doi:10.1111/zph.12007
5. Geenen PL, Graat EA, Haenen A, et al. Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms. *Epidemiol Infect.* 2013;141(5):1099-1108. doi:10.1017/S0950268812001616.
6. Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G et al. (2011). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Veterinary Research* 7:6 doi:10.1186/1746-6148-7-6.
7. Kawano J, Shimizu A, Saitoh Y, Yagi M, Saito T, Okamoto R. (1996). Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2072-2077. doi:10.1128/JCM.34.9.2072-2077.
8. Stępień-Pyśniak D, Wilczyński J, Marek A, Śmiech A, Kosikowska U, Hauschild T (2017). *Staphylococcus simulans* associated with endocarditis in broiler chickens. *Avian Pathol*, 46, 44–51.
9. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis*, 2, 677–685
10. Hasman H, Agersø Y, Hendriksen R, Cavaco L and Guerra-Roman B. LABORATORY PROTOCOL- Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat. DTU Food National Food Institute 2018.
11. Multiplex PCR for the detection of the *mecA* gene and the identification of *Staphylococcus aureus*. DTU Food National Food Institute 2009.
12. Nebbia P, Tramuta C, Odore R, Nucera D et al. (2014). Genetic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* producing cefotaximase-type extended-spectrum β -lactamases: first evidence of the ST131 clone in cats with urinary infections in Italy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(12) 966–971.
13. Reich F, Atanassova V, and Klein G (2013). Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • 19(8): 1253-1259
14. Mezhoud H, Boyenb F, Touazi L, Garmyn A et al. (2015). Extended spectrum -lactamase producing *Escherichia coli* in broiler breeding roosters: presence in the reproductive tract and effect on sperm motility. *Animal Reproduction Science* 159: 205-211
15. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F et al. (2014). Impact of Third-Generation-Cephalosporin Administration in Hatcheries on Fecal *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Broilers and Layers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 58 (9): 5428 –5434

16. Dierikx, CM, van der Goot, JA, Smith, HE, Kant, A. & Mevius, D. J. (2013b). Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One*, 8, e79005
17. Valentin L, Sharpa H, Hille K et al. (2014). Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology* 304:805-816
18. Nemeghaire S, Vanderhaeghen W, Argudi'n MA, Haesebrouck F and Butaye P (2014). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. *J Antimicrob Chemother*; 69: 2928 –2934 doi:10.1093/jac/dku268
19. Nemeghaire S, Argudi'n MA, Haesebrouck F et al. (2014). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* in healthy chickens. *Vet Microbiol*; 171: 357–63
20. Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2010;202(2):270-281. doi:10.1086/653483