ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

LA NOSTRA ESPERIENZA, LA VOSTRA **SICUREZZA.**

Primi risultati del progetto sul "Monitoraggio di resistenze antibiotiche critiche nel comparto suino regionale"

Pongolini Stefano

Modena, 27 giugno 2018

Antibiotici

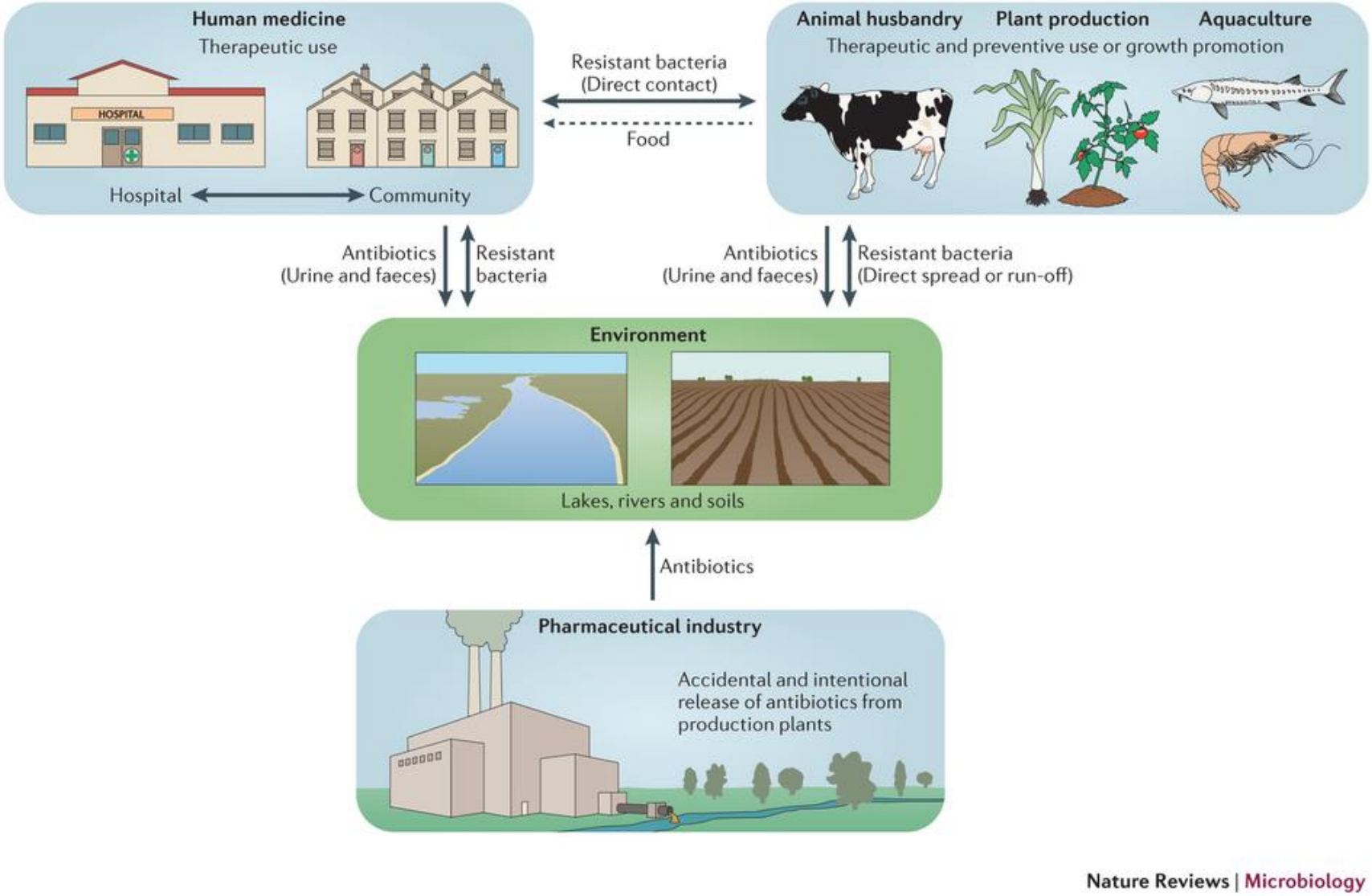
il rischio nel piatto

Alcuni batteri possono sviluppare un pericoloso meccanismo di

PRESUPPOSTI del progetto

L’antibiotico resistenza (AMR) negli ultimi decenni è diventata un problema sanitario globale di enormi dimensioni.

Nonostante nel tempo siano stati attivati diversi piani di monitoraggio e/o d’azione per il contenimento delle resistenze, ad oggi mancano conoscenze accurate sulla responsabilità dei diversi comparti (popolazione umana/comunità, ospedali, allevamenti, ambiente ecc.) coinvolti nel fenomeno



- AMR spreads through resistant bacteria and resistance genes
- AMR can be seen as a complex ecological issue

OBIETTIVI del progetto

In questo contesto, il progetto si propone di raccogliere dati utili a verificare l’eventuale presenza di geni di antibiotico resistenza negli allevamenti, con il fine di valutare l’eventuale condivisione di geni di antibioticoresitenza tra il comparto zootecnico e la popolazione umana.

Valutare in 75 allevamenti suini, da riproduzione e da ingrasso, ciclo aperto e ciclo chiuso, del territorio regionale

- la presenza di geni “di resistenza”
- la presenza di batteri con resistenze di interesse

OBIETTIVO del progetto

Particolare attenzione sarà rivolta alla ricerca di geni di resistenza nei confronti di antibiotici definiti d'importanza critica in ambito clinico:

1) geni "mcr" veicolanti resistenza a colistina

2) cefalosporinasi

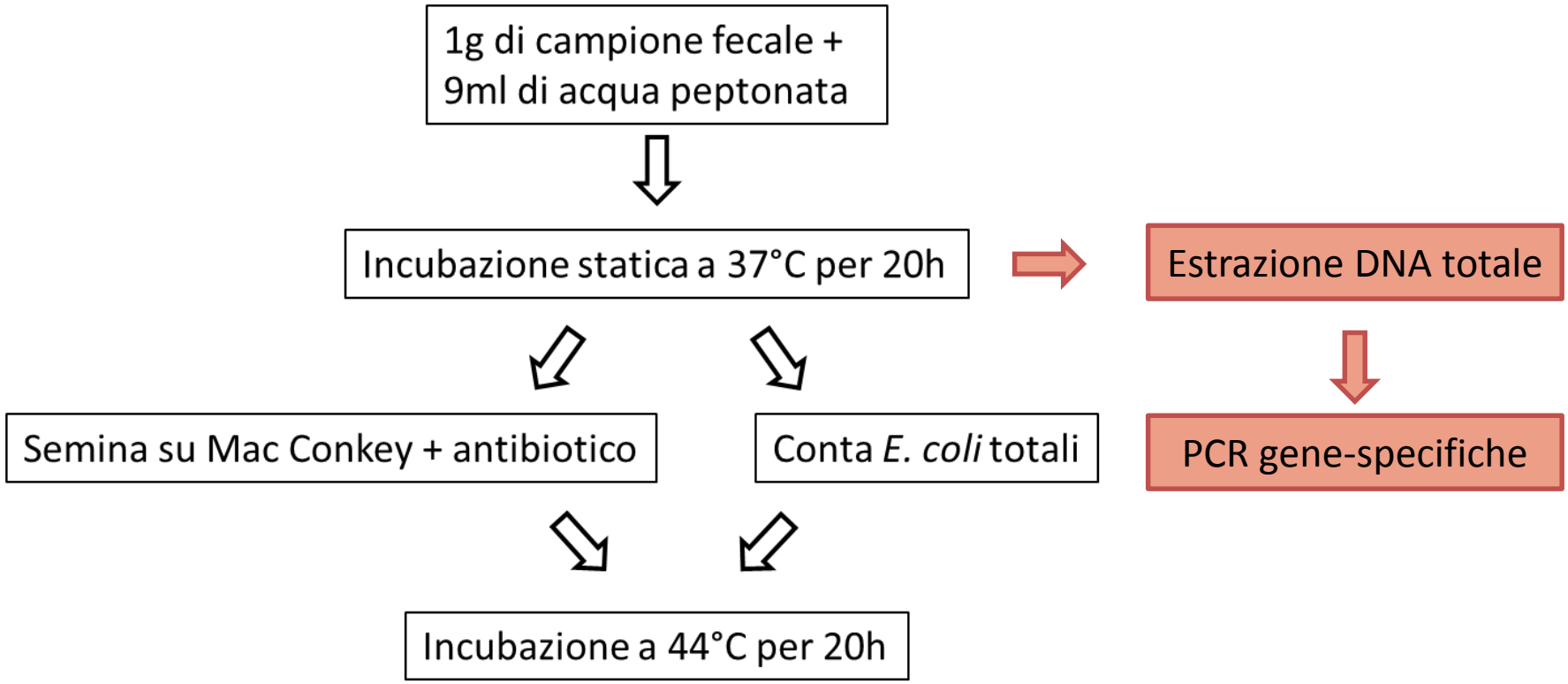
3) carbapemenasi

Metodi - campionamento

- 100 gr di feci fresche (cioè appena emesse dagli animali e non ancora fermentate in vasche di raccolta o altri processi alterativi) prelevate dai pavimenti in cui soggiornano gli animali
- campione fecale dovrà essere ragionevolmente rappresentativo dell’allevamento o del settore considerato
- campione finale ricavato da almeno 10 prelievi elementari, eseguiti in diversi punti dell’allevamento, uniformemente distribuiti
- conservati a temperatura di refrigerazione (5°+/-3°C) per max 5gg

Metodi – laboratorio

Materiale di partenza: feci fresche



Antibiotici: cefotaxime 1 mg/L, meropenem 0,125 mg/L, colistina 1 mg/L

DTU PROTOCOL

“Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing E. coli from caecal samples - February 2018»

Pre-enrichment: 1 g ± 0.1 g of caecal sample is added to 9 mL of buffered peptone water (BPW)

Incubate the tubes at 37°C ± 1°C for 18-22 h.

10 µL loop of the overnight culture by applying a single streak onto a MacConkey agar plate containing antibiotic

Incubate the plates at 44°C ± 0.5°C for 18-22 h.

Sub-cultivation

Presumptive E. coli colonies from onto MacConkey agar plate supplemented with 1 mg/L cefotaxime to maintain the selective pressure.

Identification and storage of isolates

IZSLER PROTOCOL

1 g feci + 9 ml acqua peptonata

Incubare senza agitazione 37°C 20h

Seminare 10µl su MacConkey antibiotato (Cefotaxime 1mg/l, Meropenem 0.125mg/l, Colistina1mg/l) e su Mac Conkey senza antibiotici per le conte di E. coli totali

Incubare le piastre a 44°C 20 h

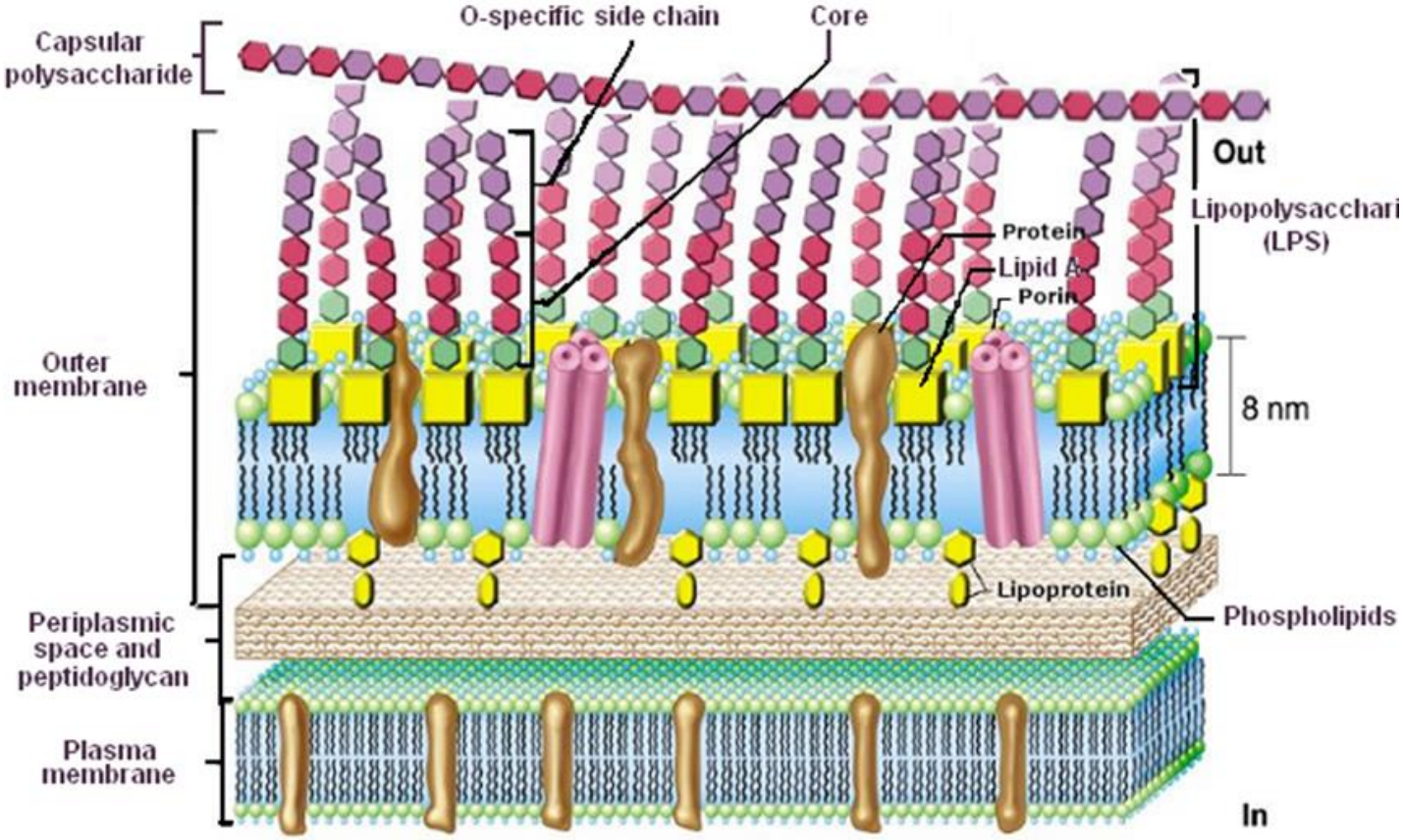
Conferma di resistenza e di specie

Congelamento di colonie vive resistenti

Metodi – geni di AMR (PCR)

- Estrazione DNA totale da feci in acqua peptonata (300 uL) mediante DNA Mini Stool Kit (Qiagen)
- PCR del DNA estratto dei seguenti target:
  - geni **mcr (1-5):**
    protocollo DTU: Eurosurv. 2018;23(6):pii=17-06672
  - geni che codificano per **cefalosporinasi:**
    a) Extended Spectrum β-lactamase (ESBL): CTX-M, TEM, SHV (Monstein et al 2007)
    b) AmpC (Pérez-Pérez e Hanson, 2002)
  - geni che codificano per **carbapenemasi**
    KPC, NDM, VIM, OXA-48, IMP, SPM, BIC, AIM, DIM, GIM, SIM (Poirel et al, 2011 modificato per PCR singole)

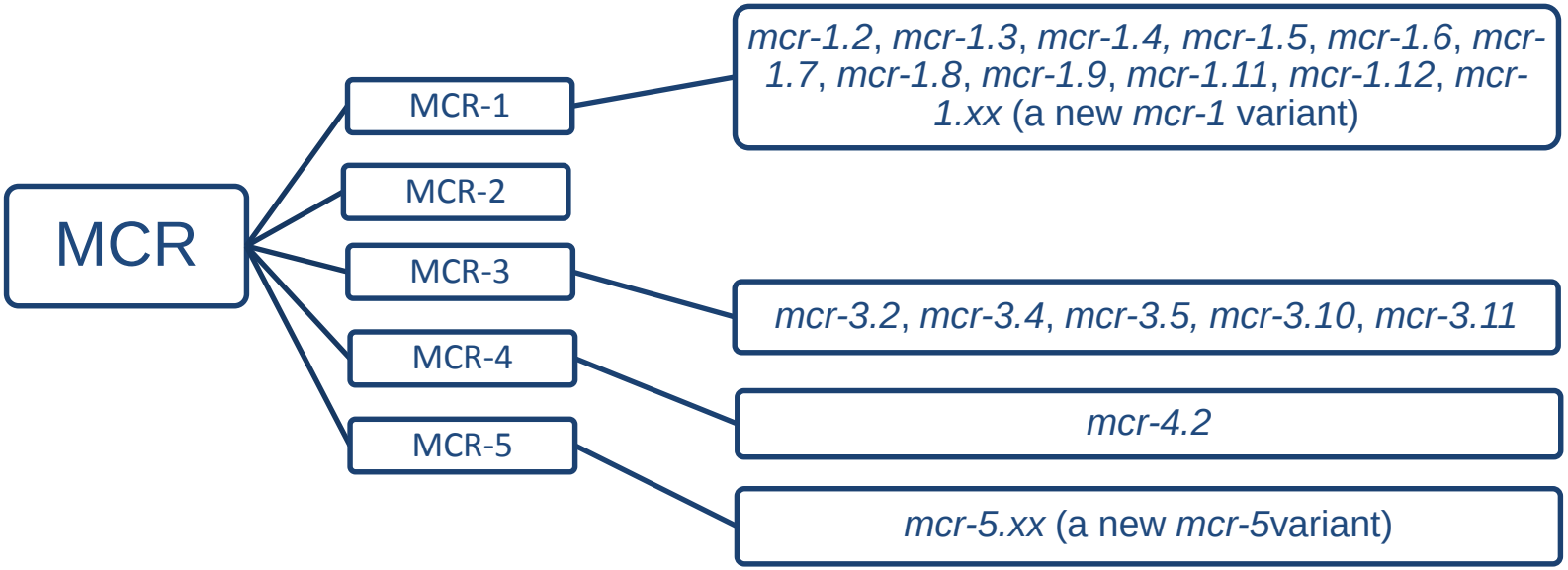
mcr: plasmid-mediated colistin resistance



***mcr*: codifica per fosfoetanoamminatransferasi (sul lipide A)**

mcr: plasmid-mediated colistin resistance

Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Ana Rita Rebelo et al.2017**



Le rimanenti varianti conosciute, *mcr-1.10, mcr-2.2, mcr-3.3, mcr-3.6, mcr-3.7, mcr-3.8* e *mcr-3.9 non sono state riportate* in *Enterobacteriaceae*, ma sono state trovate solo in *Moraxella* spp. e *Aeromonas* spp

Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*

Yong-Qiang Yang Yun-Xia Li Chang-Wei Lei An-Yun Zhang Hong-Ning Wang

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. April 2018

β-lattamasi

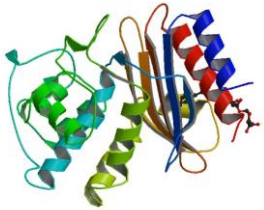
Extended Spectrum β-lactamase (ESBL)

- sono forme mutate di β-lattamasi
- inattivano cefalosporine di 3 e 4° generazione e monobactani (aztreoam)
- non idrolizzano i carbapenemi e sono inibite da ACIDO CLAVULANICO, TAZOBACTAM, SULBACTAM, classici inibitori delle β-lattamasi

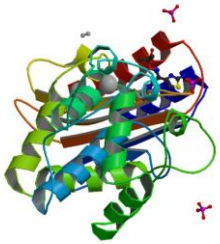
AmpC

- Spettro meno esteso rispetto ad ESBL ma insensibile agli inibitori delle b-lattamasi

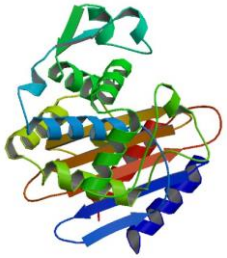
Cefalosporinasi



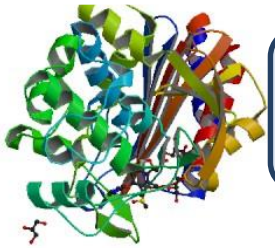
SHV: configurazione del sito attivo modificata permettendo l'ingresso a β-lattamici



TEM configurazione del sito attivo modificata: permettono l'entrata ai substrati oximino-β-lattamici.



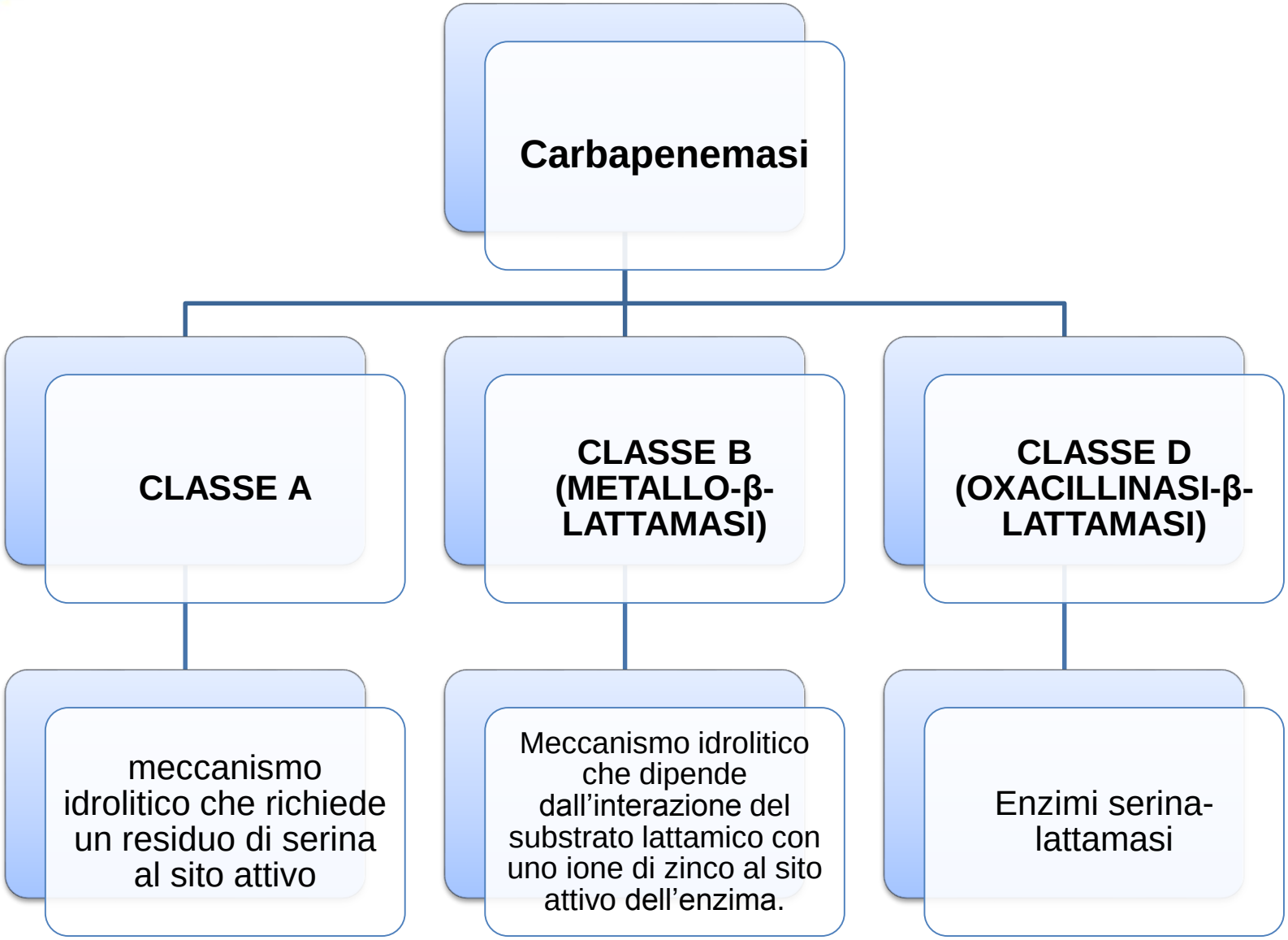
CTX-M acquisizione plasmidica di geni beta-lattamasi.

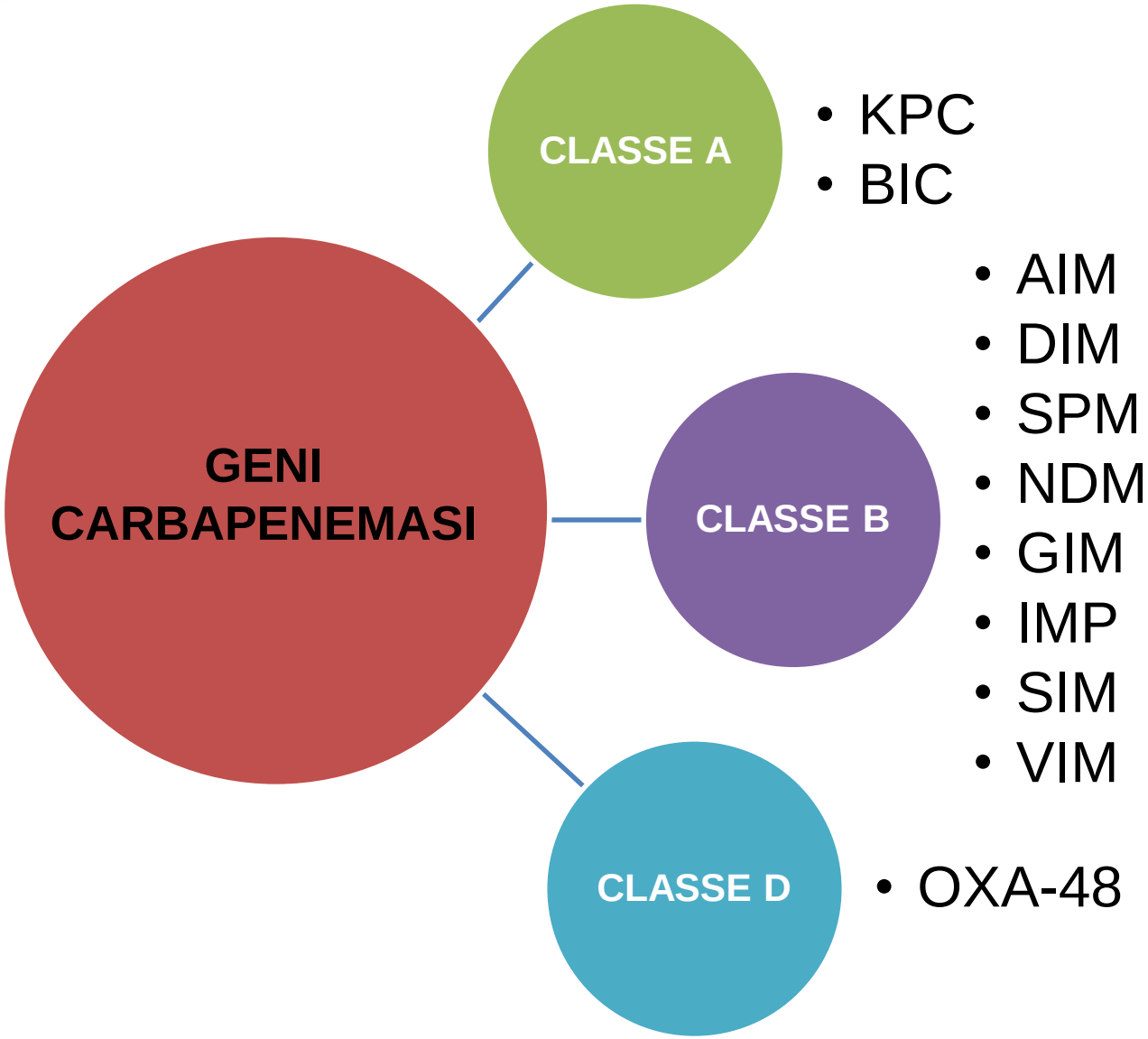


AmpC la sua espressione è solitamente inducibile possono anche essere trasportate su plasmidi

Extended Spectrum β-lactamase (ESBL)

Carbapenemasi

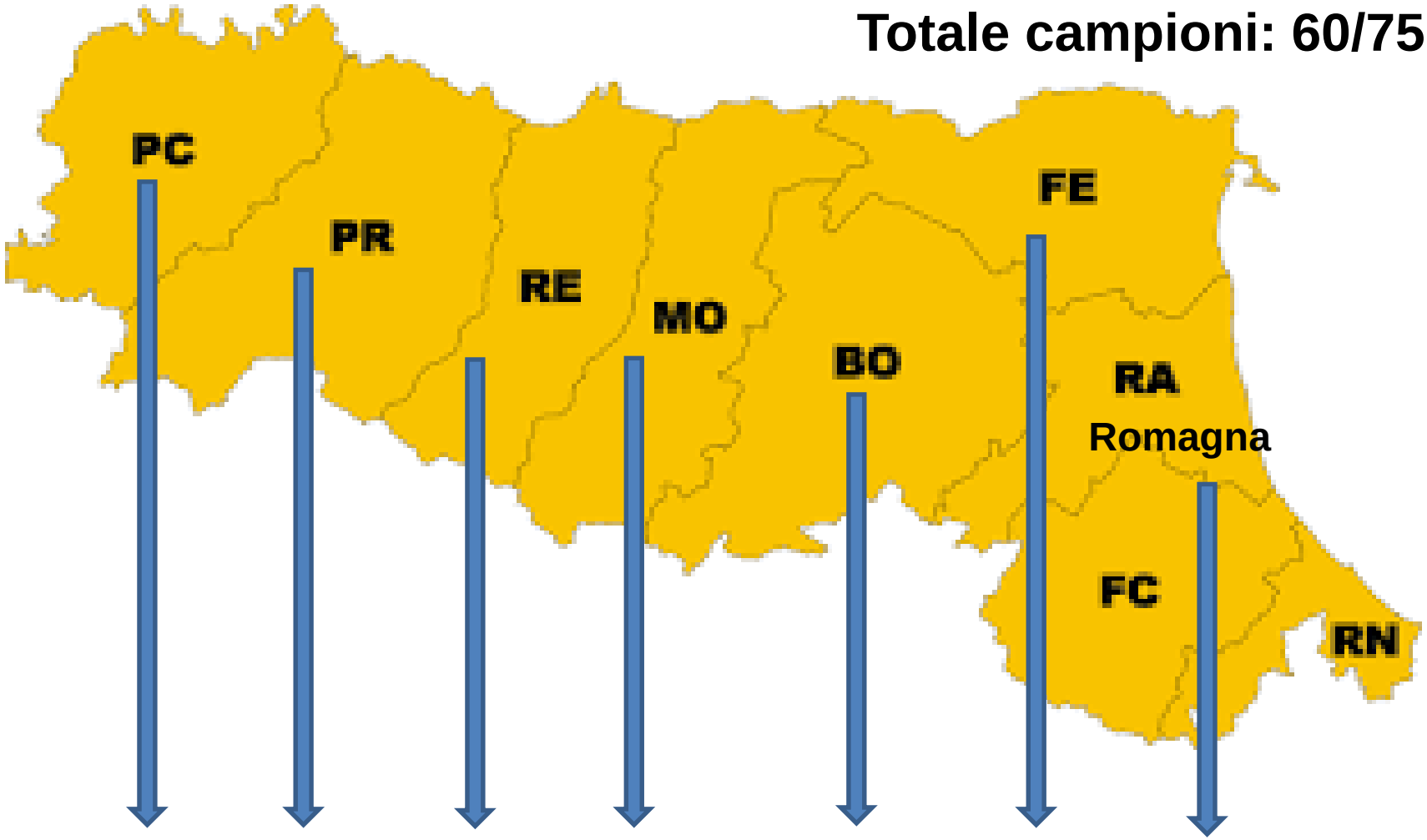



GENI CARBAPENEMASI
CLASSE A
• KPC
• BIC
CLASSE B
• AIM
• DIM
• SPM
• NDM
• GIM
• IMP
• SIM
• VIM
CLASSE D
• OXA-48

GENE AMR	COMPARTO UMANO	COMPARTO VETERIANARIO
MCR 1-5	✓	✓ in particolare mcr1
SHV	✓poco presente 4%	✓15%*
CTX-M	✓24%*	✓55%*
TEM	✓6%*	✓29%*
AmpC	✓	✓
KPC	✓	✓
NDM	✓	✓
VIM	✓	✓
IMP	✓	✓
SIM	✓	✗
GIM	✓	✗
BIC	✓	✗
OXA-48	✓	✓ (raro)
SPM	✓	✗
AIM	✓	✗
DIM	✓	✗

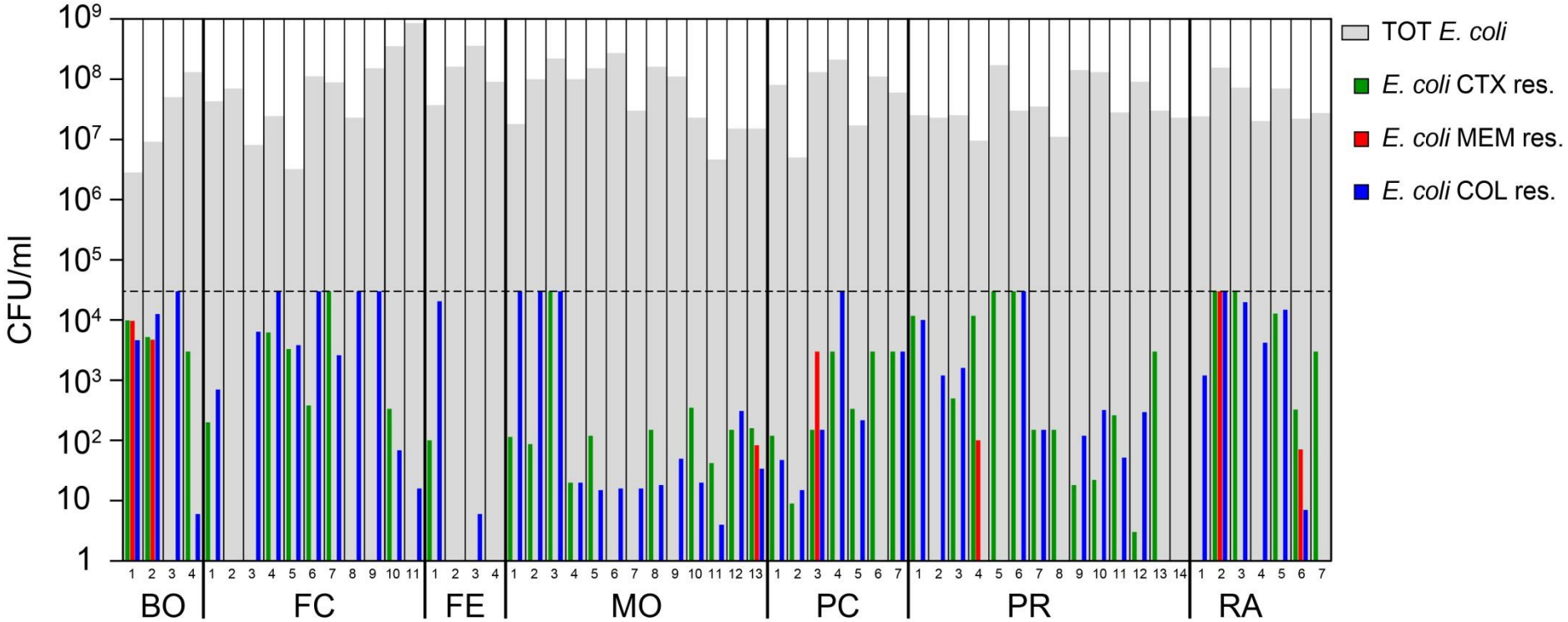
Campioni pervenuti e processati

Totale campioni: 60/75

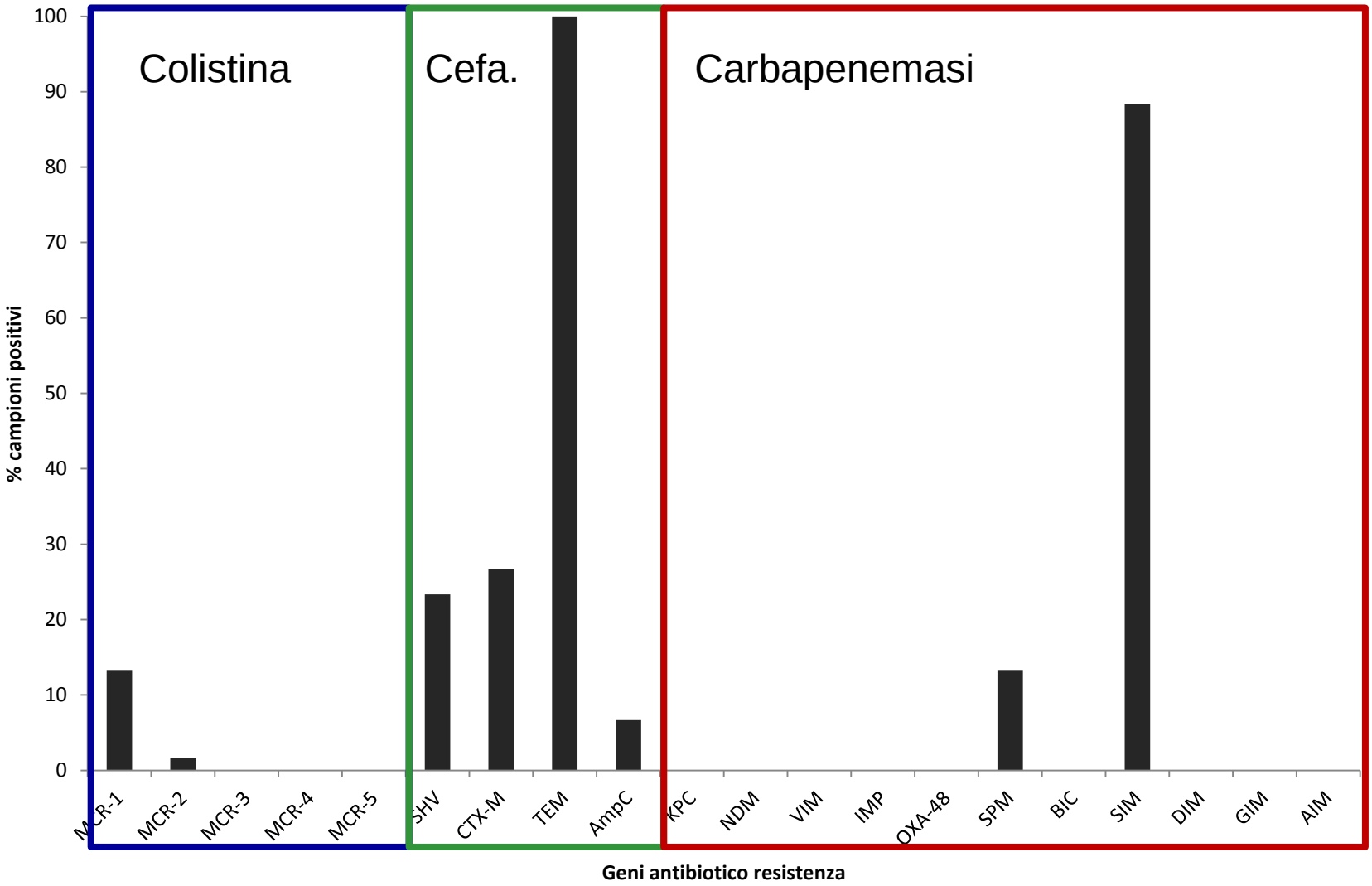


PC	PR	RE	MO	BO	FE	RA Romagna	FC	RN
7/10	14/10	0/15	13/15	4/7 (2 Imola)	4/3	18/15 (7 RA, 11 FC)		

Risultati microbiologici

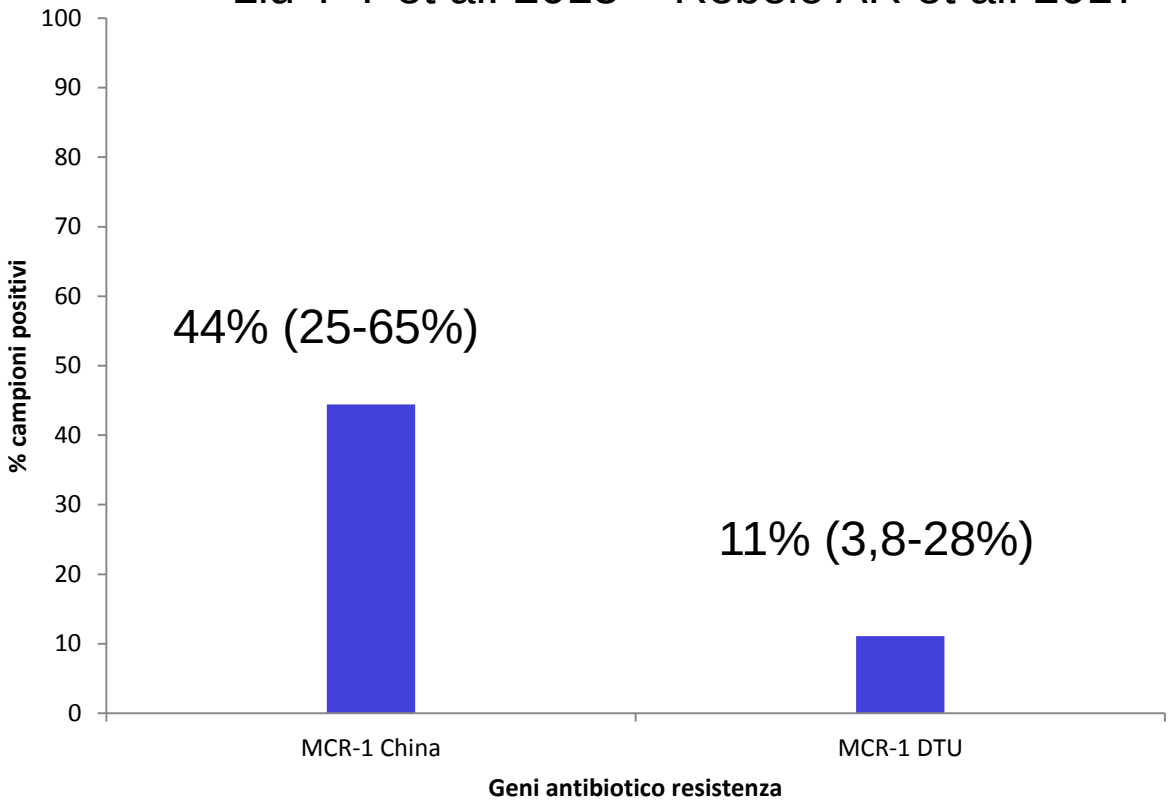


Prove Genetiche - PCR



Prove Genetiche - PCR

Confronto metodi su 27 campioni PCR
Liu Y-Y et al. 2015 – Rebelo AR et al. 2017



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO
Sede Centrale Brescia
Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia - Italy
T. +39 030 2290.1 - F. +39 030 2425251
info@izsler.it - www.izsler.it