



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

LE API COME INDICATORE AMBIENTALE DI ANTIMICROBICO-RESISTENZA

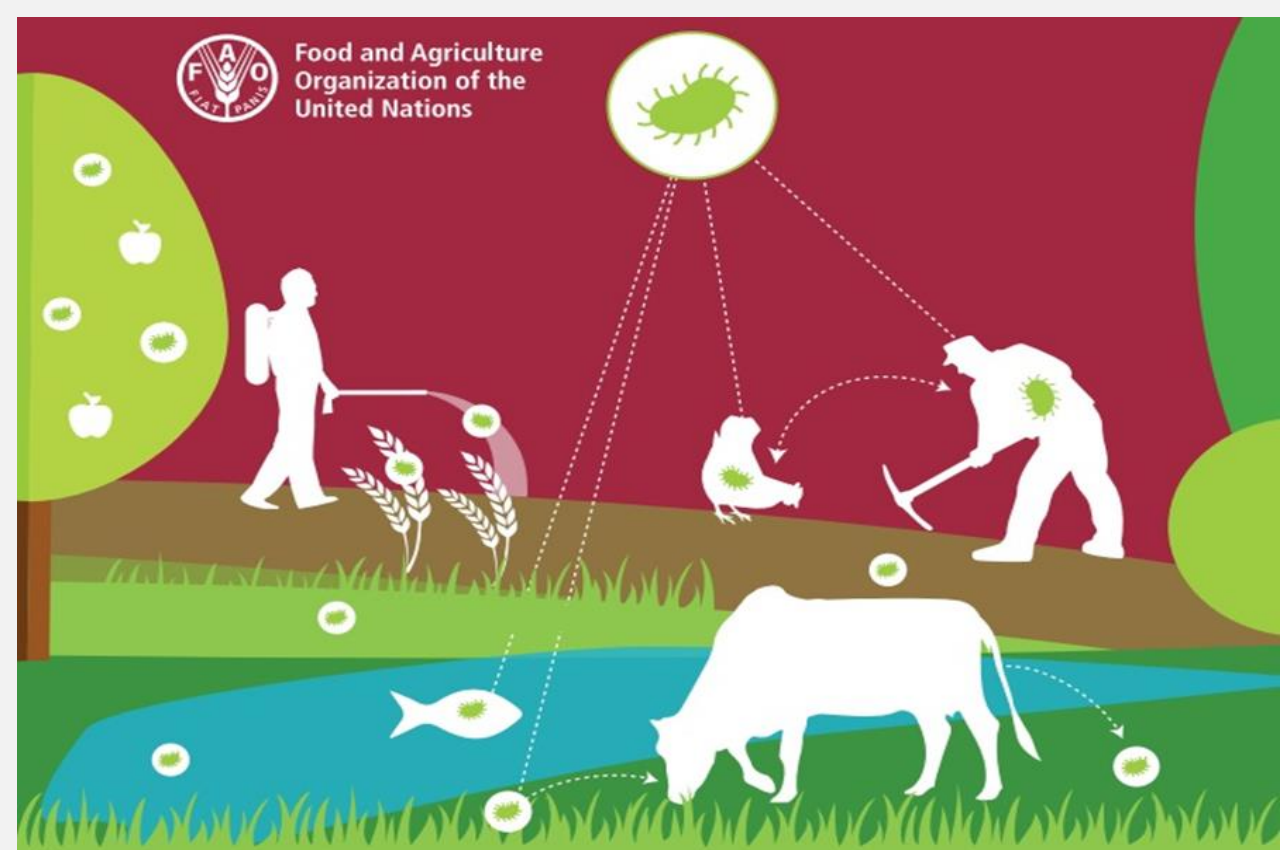
Marti Eleonora

DIMEVET - Scuola di specializzazione Sanità animale, allevamento e produzioni zootecniche (UNIBO)

eleonora.marti3@studio.unibo.it

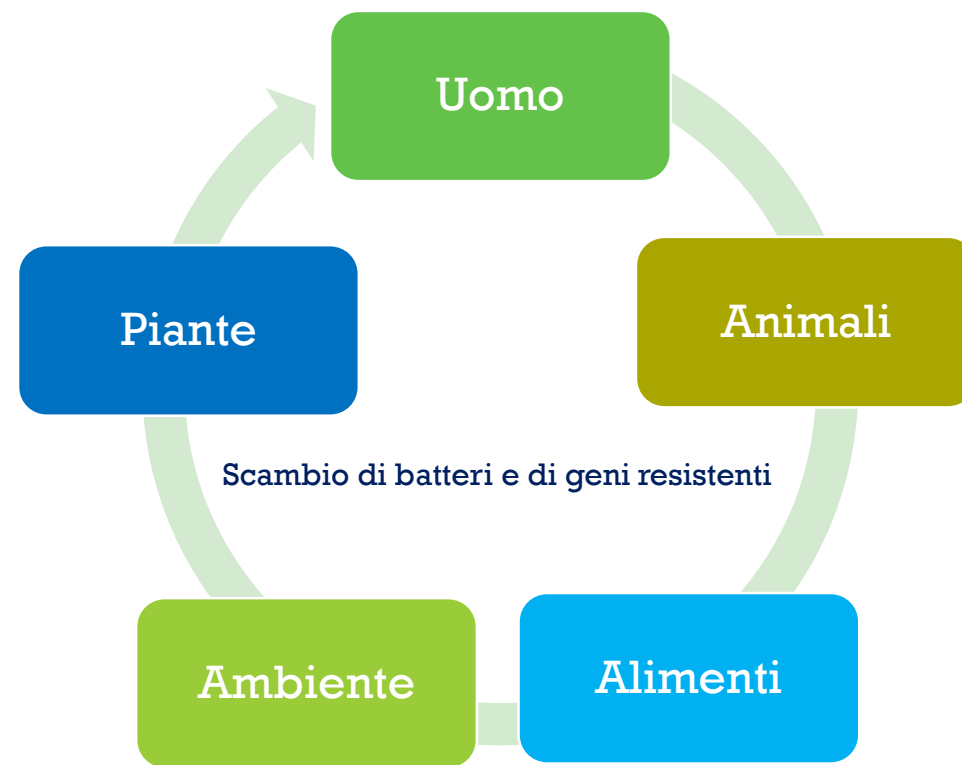


Food and Agriculture
Organization of the
United Nations



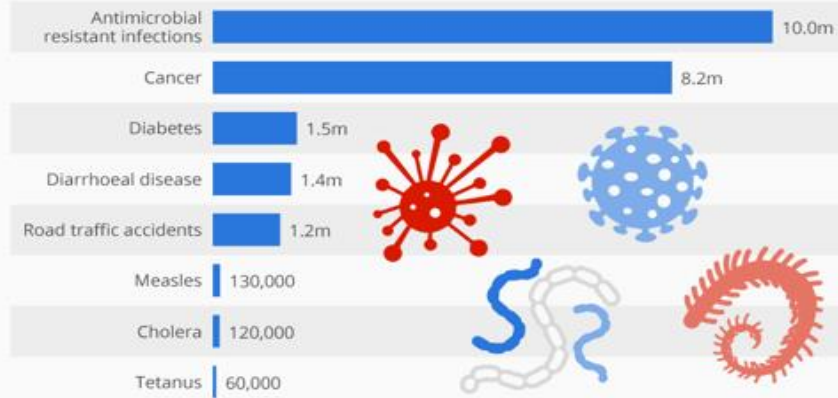
ANTIMICROBICO-RESISTENZA

Fenomeno che si verifica quando un batterio è in grado di resistere all'azione di un antimicrobico a cui risulta naturalmente sensibile.



Deaths From Drug-Resistant Infections Set To Skyrocket

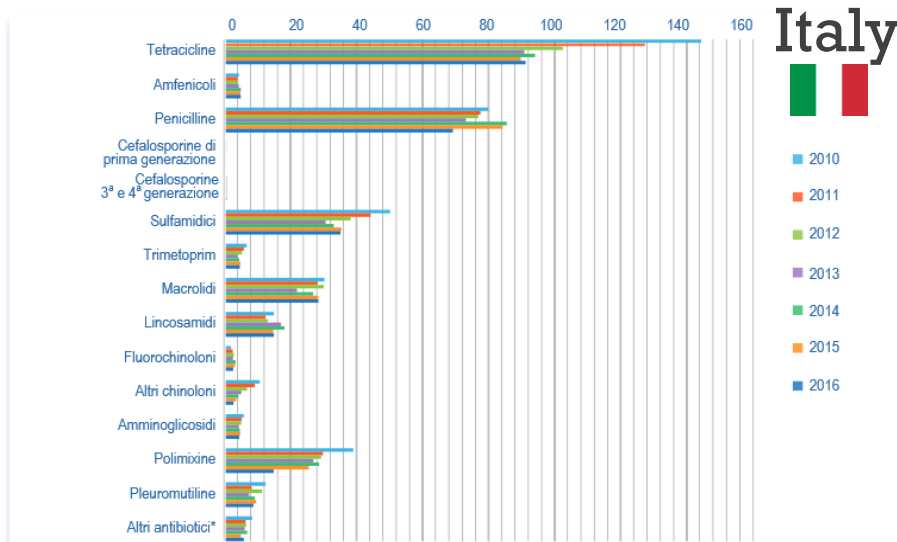
Deaths from antimicrobial resistant infections and other causes in 2050



Source: Review on Antimicrobial Resistance

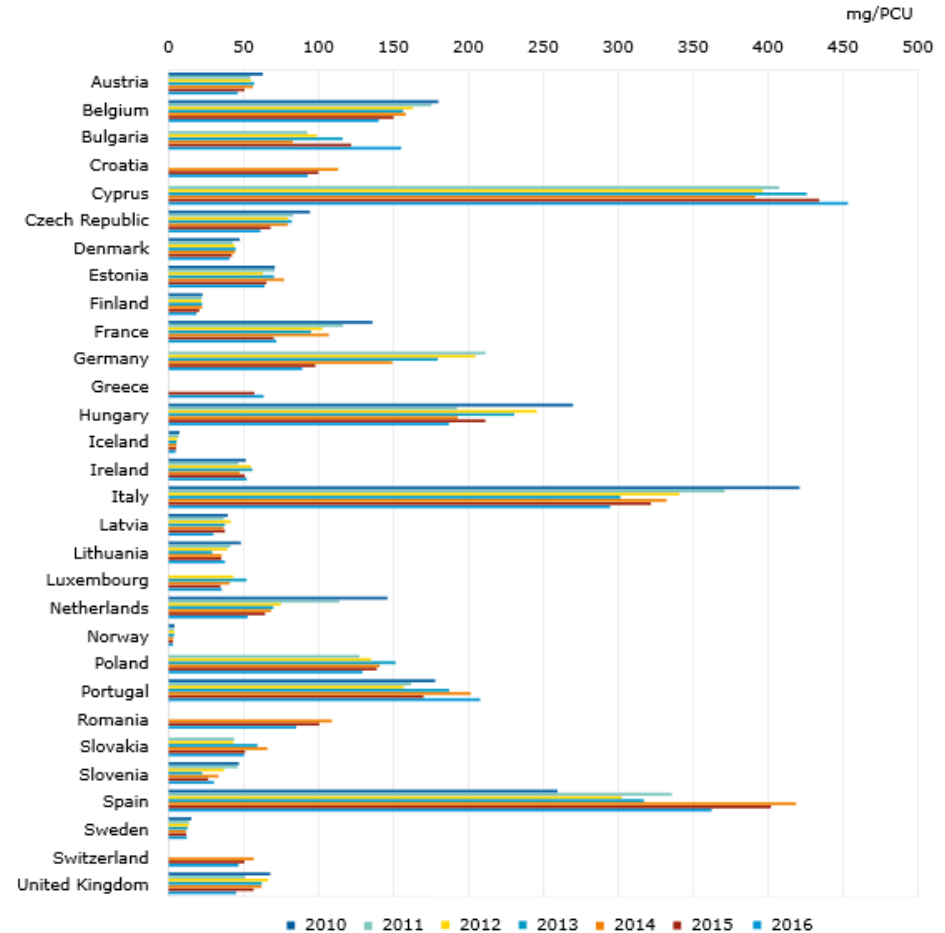
statista

Figura 4 – Distribuzione italiana (mg/PCU) delle diverse classi di antimicrobici nelle specie produttrici di alimenti compresi gli equidi, nel periodo 2010-2016



Italy

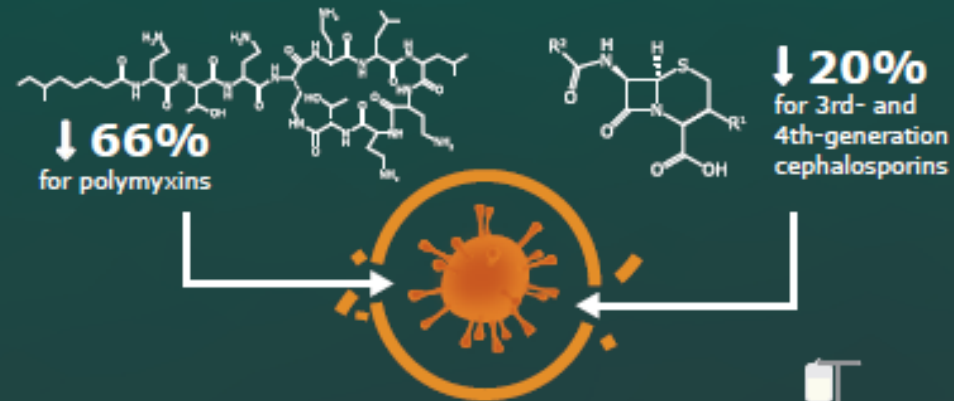
Figure 33. Total sales of veterinary antimicrobial agents for food-producing species, in mg/PCU, from 2010 to 2016, for 30 European countries¹⁻³



UE

Europe is on the right track to fight antibiotic resistance...

2011-2017
Sales of antibiotics for veterinary use are down



Polymyxins and cephalosporins are used to treat serious infections in people caused by bacteria resistant to most treatments – this **saves lives**



Strategie di controllo

MONDIALI

- OMS: Global Action Plan for antimicrobial resistance

EUROPEE

- OIE: Terrestrial Animal Health Code on the prudent and responsible use of antimicrobials in the veterinary sector
- ECDC/EFSA 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)
- Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016 (EMA, 2018).
- Linee Guida Europee sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria (2015/C 299/04)

NAZIONALI

- Piano Nazionale di Contrasto dell' Antimicrobico-Resistenza (Ministero della Salute 2017-2020)
- Linee guida per l'uso prudente degli antimicrobici negli allevamenti zootecnici per la prevenzione dell'antimicrobico-resistenza e proposte alternative (Ministero della Salute 2018)
- Decreto Legislativo 4 aprile 2006, n. 191 «Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici»

REGIONALI

- Linee guida regionali sull'uso prudente dell'antibiotico per il bovino da latte, suino, PETs (Regione Emilia-Romagna, 2018)

Scopo del lavoro

Studio dell' AMBIENTE per conoscere il tasso di resistenza dei batteri che lo popolano



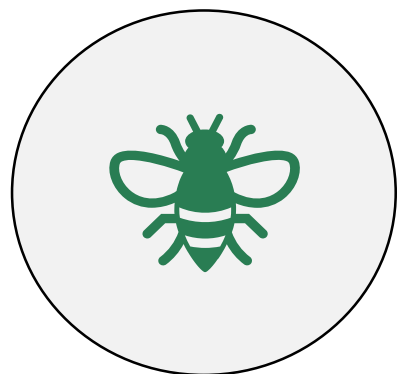
Liquami
Acque reflue
Falde acquifere



Suolo



Uccelli e
mammiferi
selvatici



APE COME INDICATORE AMBIENTALE DI
ANTIMICROBICO-RESISTENZA



Insetto impollinatore in grado coprire una superficie di volo pari a **7 km²**.

Il suo **microbioma intestinale** è composto da 5 diverse specie batteriche, ma anche popolazioni numericamente inferiori albergano nel tratto intestinale di *Apis mellifera* tra cui le **Enterobacteriaceae**.

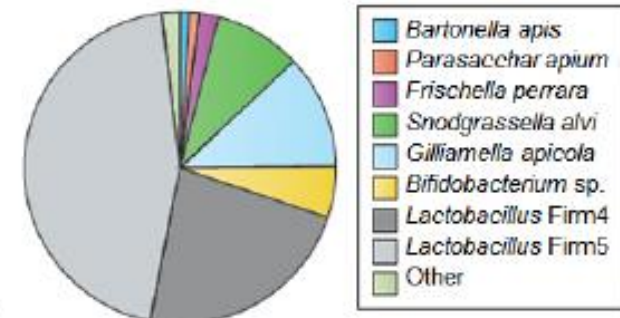
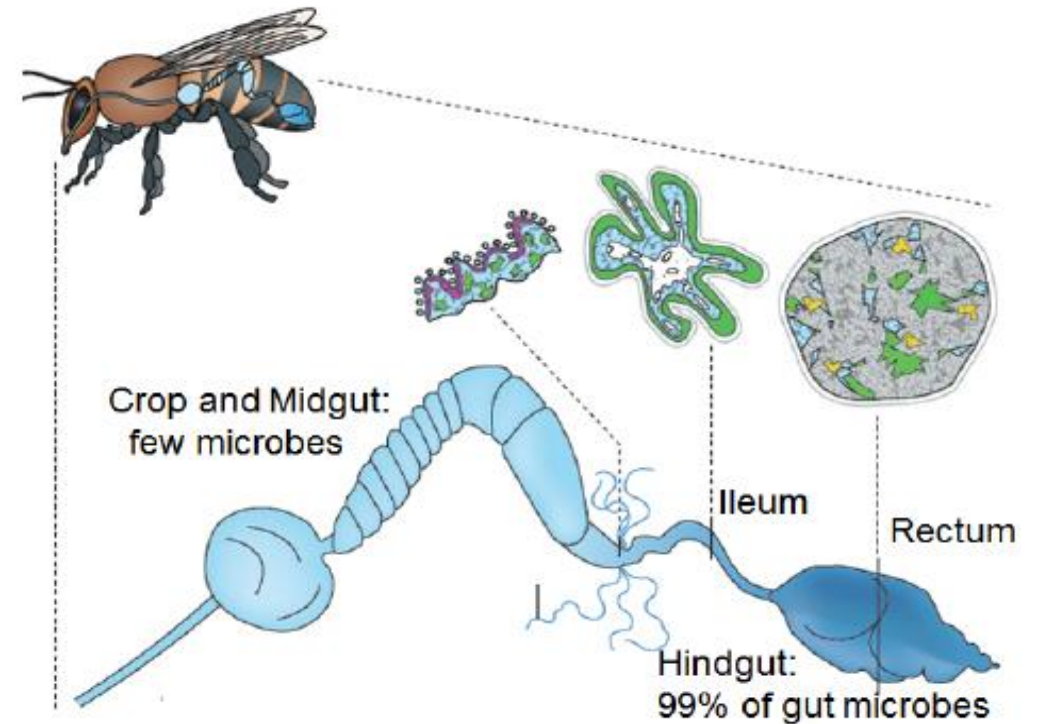
L'ape assume le **Enterobacteriaceae** per contatto diretto dall'ambiente circostante alla colonia.



Indicatori del tasso di antimicrobico-resistenza dell'ambiente, visto che le api non vengono trattate con antimicrobici (Reg. UE n° 37/2010).

L'uso in deroga è strettamente regolato (Direttiva 2001/82/CE).

Apis mellifera

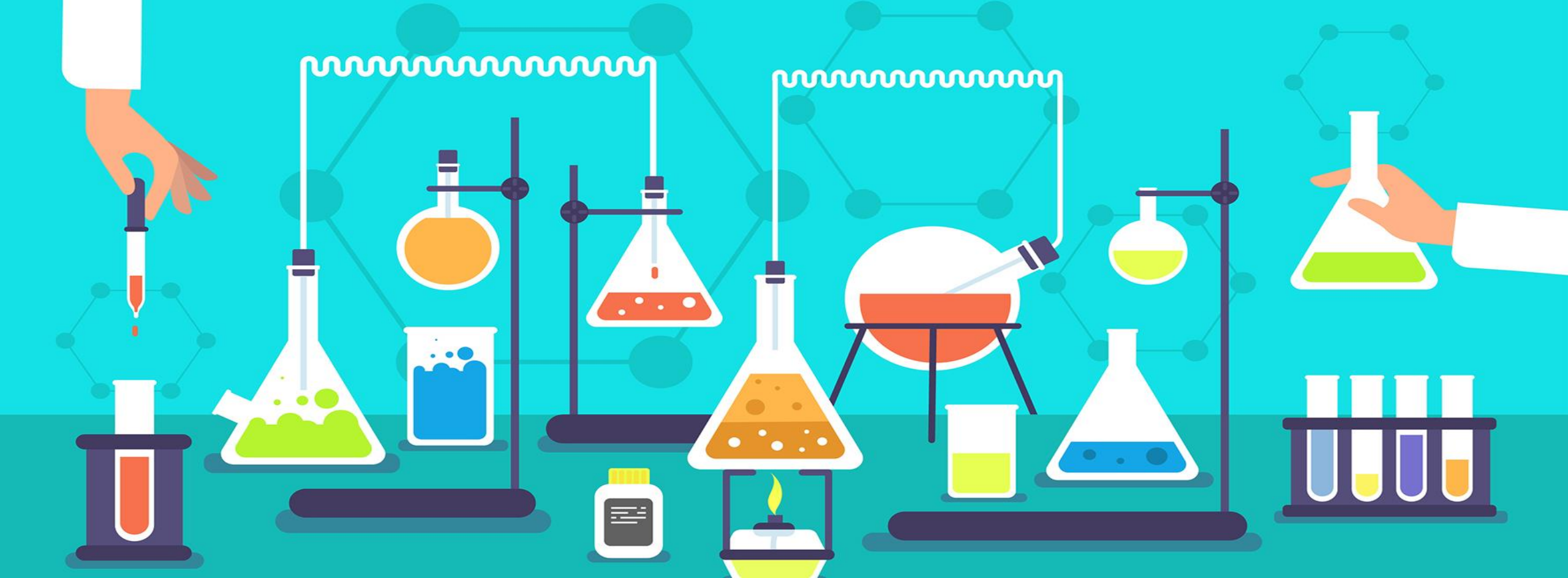


(Kwong and Moran, 2016).



Perché le **Enterobacteriaceae**?

- Problema emergente in Sanità Pubblica per le infezioni da essi causate
- Buoni indicatori per studi ambientali di AMR
- Acquisite per semplice contatto diretto



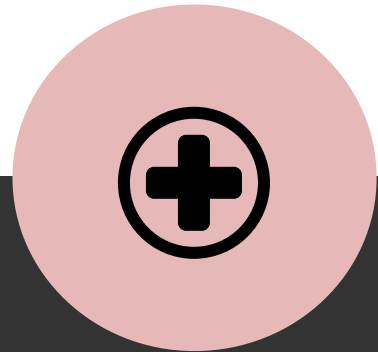
Materiali e Metodi

Campionamento

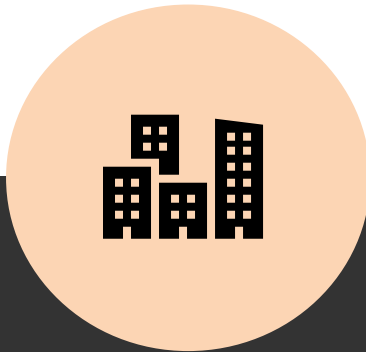
5 siti ambientali in provincia di Bologna in cui abbiamo ipotizzato una diversa pressione selettiva:



**ES 1:
Collinare**



**ES 2:
Collinare affetto
da peste
americana**



**ES 3:
Urbano**



**ES 4:
In prossimità di un
allevamento
intensivo di bovini**



**ES 5:
In prossimità di un
allevamento
biologico di bovini**

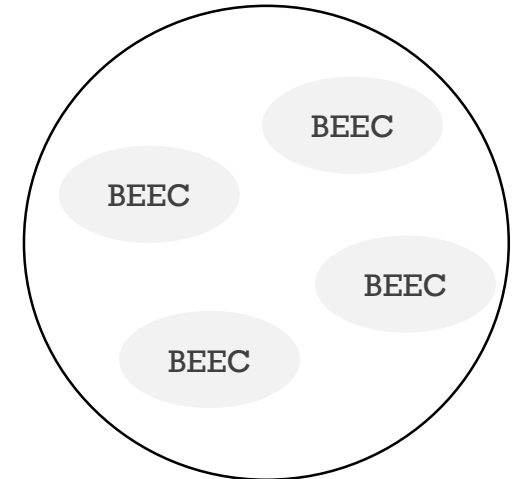
Campionamento



- Eutanasia
- Estrazione dell'intestino in maniera asettica
- Introduzione dell'intestino in soluzione salina e sua omogenazione



Da ogni sito ambientale



$$\text{TOT} = 4 \times 5 = 20 \text{ BEEC}$$

Isolamento batterico

- Semina di 10 μl di ogni unità campionaria BEEC su 2 piastre di Agar MacConkey e incubazione a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24-48 ore in aerobiosi.
- Valutazione macroscopica e microscopica di colonia.
- Clonaggio delle colonie su TSA (Tryptic Soy Agar)



Identificazione molecolare

- Estrazione del DNA (Sigma-Aldrich)
- Polymerase Chain Reaction (PCR) 16s rRNA (primer 27-f e 1492-r)
- Sequenziamento (Eurofins Genomics) e analisi delle sequenze (BioEdit e MEGA software)
- BLAST



Identificazione fenotipica

- Galleria API 20E (BioMérieux).



Kirby-Bauer Test

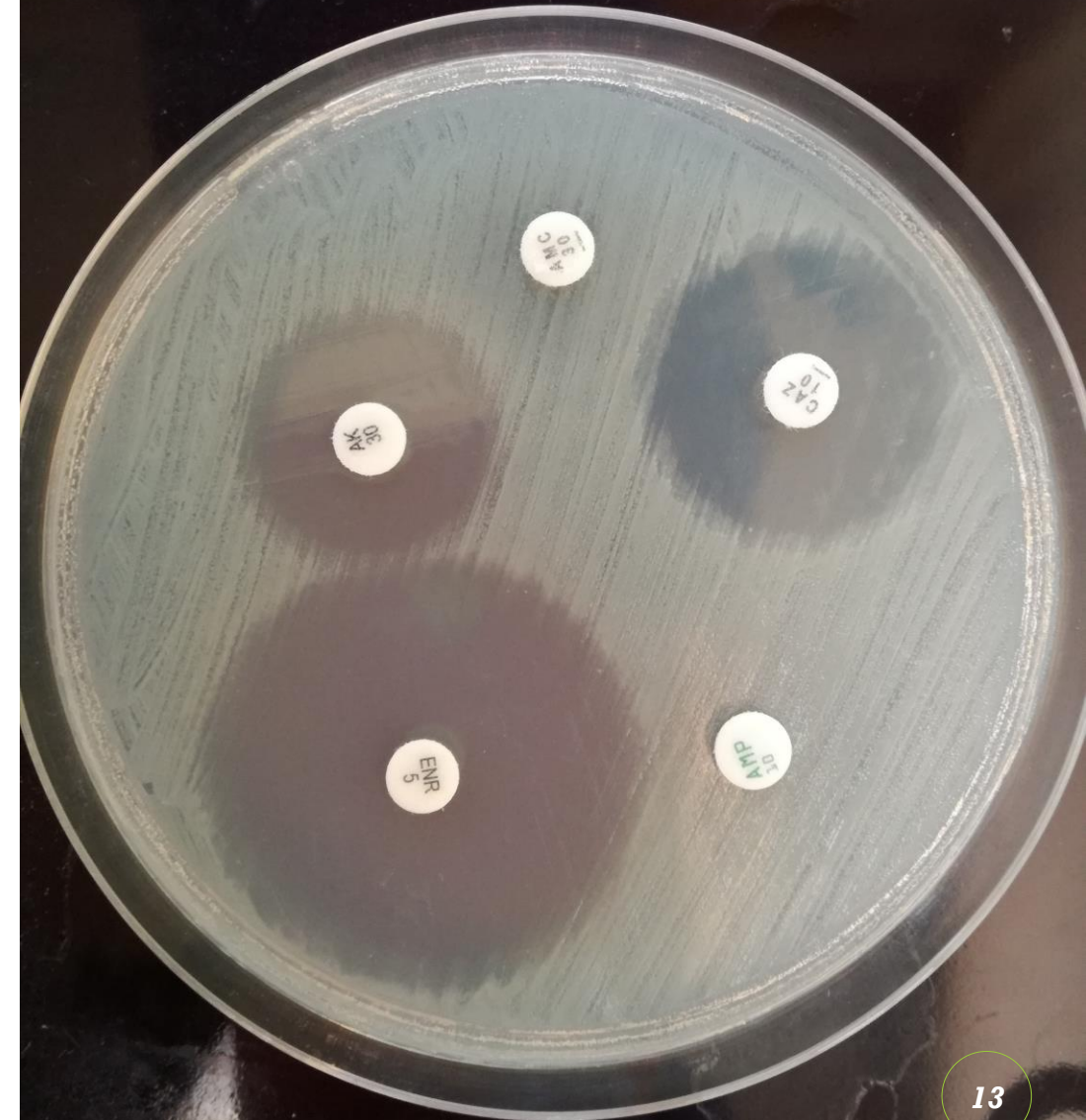
9 antimicrobici:

- ampicillina (AMP)
- amoxicillina e acido clavulanico (AMC)
- cefazolina (CZ)
- ceftazidime (CAZ)
- tetraciclina (TE)
- imipenem (IMP)
- enrofloxacin (ENR)
- amikacina (AK)
- trimetoprim e sulfamethoxazole (SXT)

Breakpoint epidemiologici EUCAST

Breakpoint clinici EUCAST

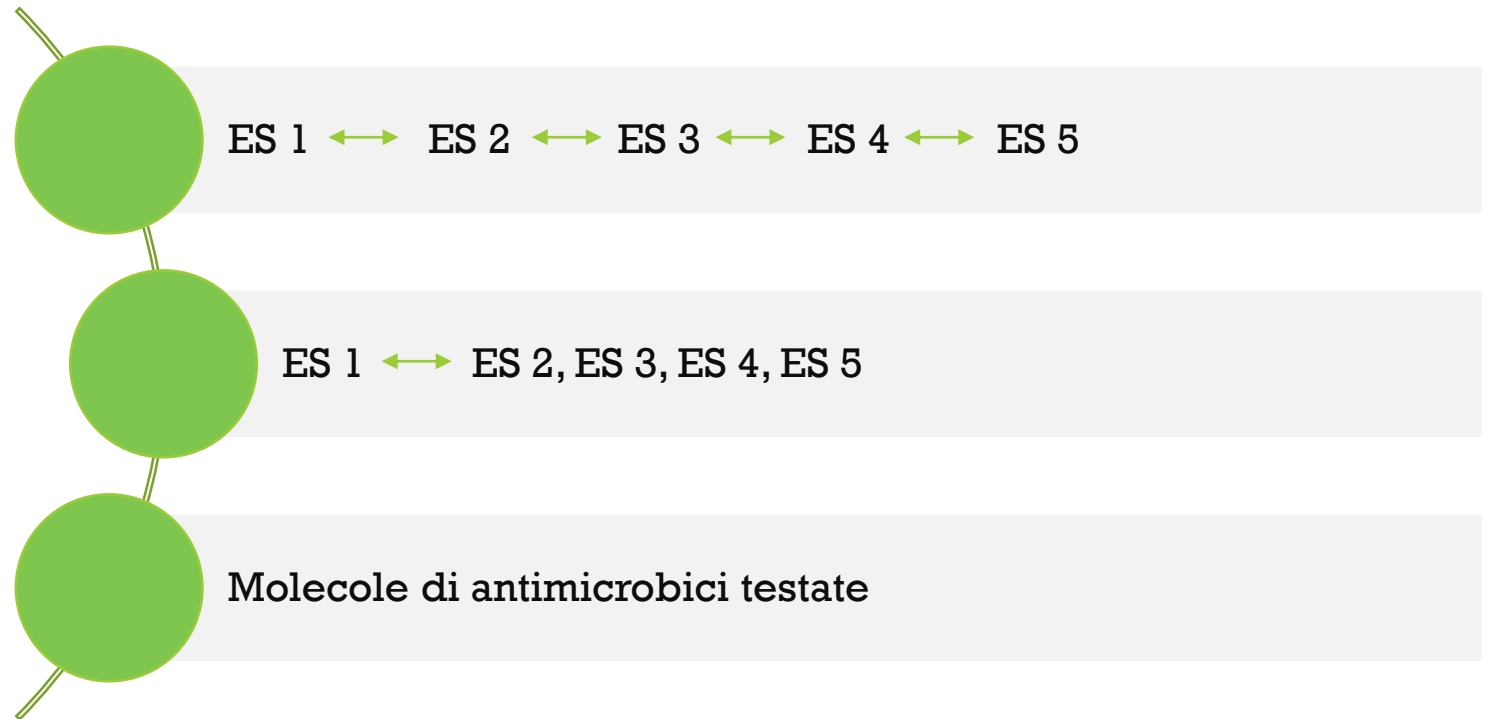
Breakpoint clinici CLSI

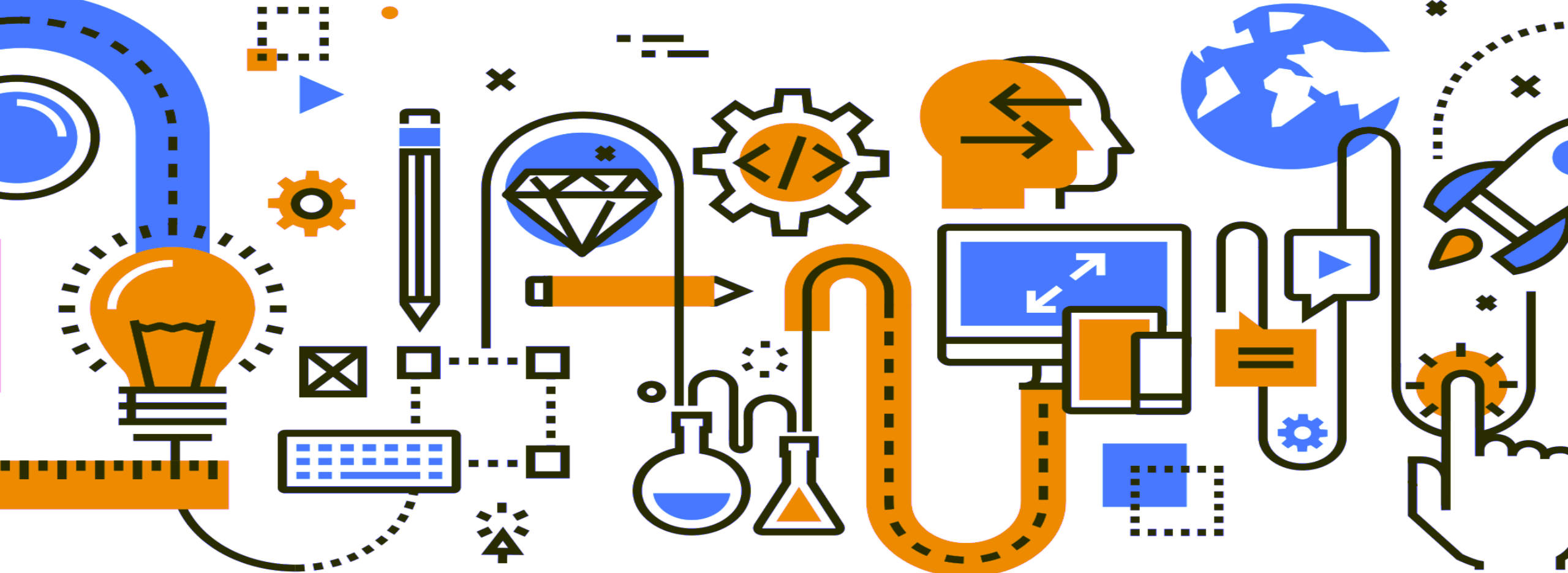


Analisi statistica



ANALISI STATISTICA
PRISM 5.0 software
 $P < 0,05$





Risultati e discussioni

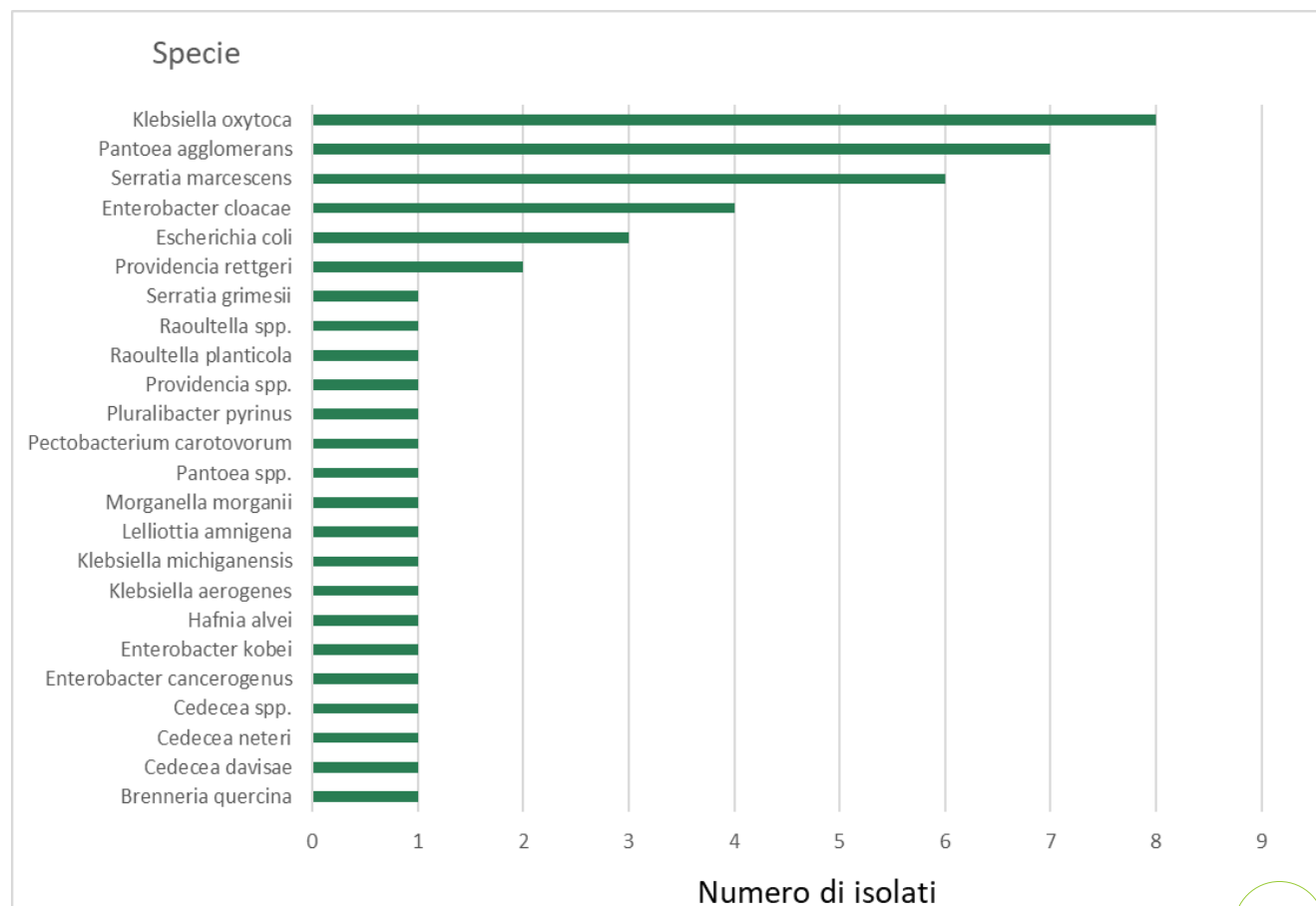
Risultati e discussioni

Species	N° isolates	%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	16.66
<i>Pantoea agglomerans</i>	7	14.6
<i>Serratia marcescens</i>	6	12.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	8.33
<i>Escherichia coli</i>	3	6.25
<i>Providencia rettgeri</i>	2	4.16
<i>Brenneria quercina</i>	1	2.08
<i>Cedecea davisae</i>	1	2.08
<i>Cedecea neteri</i>	1	2.08
<i>Cedecea spp.</i>	1	2.08
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	2.08
<i>Enterobacter kobei</i>	1	2.08
<i>Hafnia alvei</i>	1	2.08
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	2.08
<i>Klebsiella michiganensis</i>	1	2.08
<i>Lelliottia amnigena</i>	1	2.08
<i>Morganella morganii</i>	1	2.08
<i>Pantoea spp.</i>	1	2.08
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1	2.08
<i>Pluralibacter pyrinus</i>	1	2.08
<i>Providencia spp.</i>	1	2.08
<i>Raoultella planticola</i>	1	2.08
<i>Raoultella spp.</i>	1	2.08
<i>Serratia grimesii</i>	1	2.08
Total	48	100

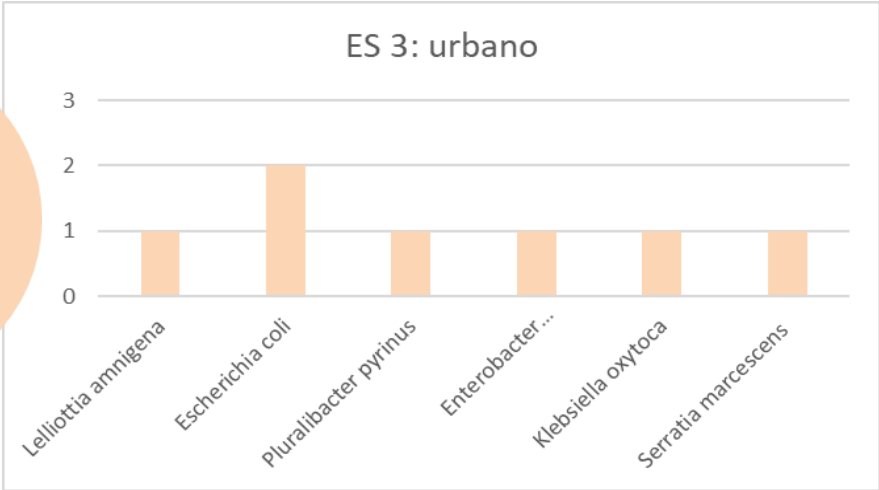
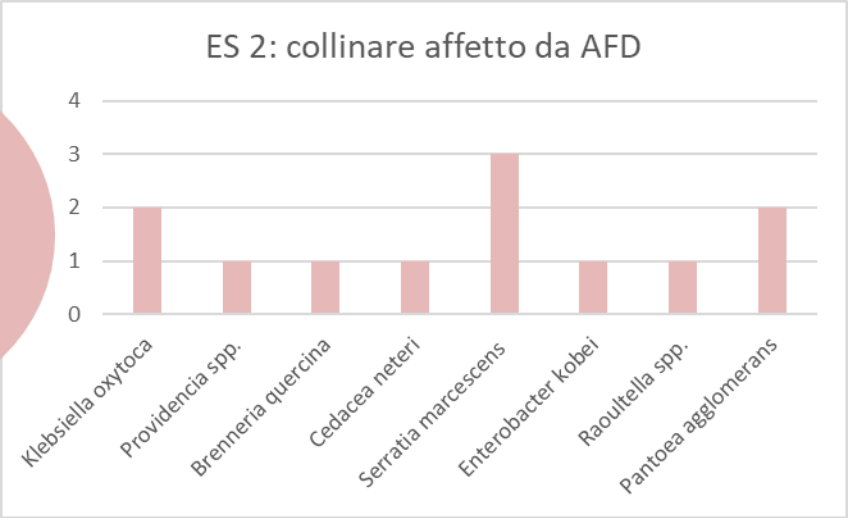
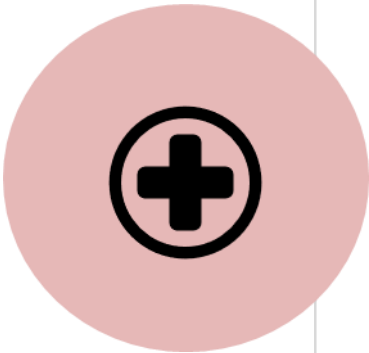
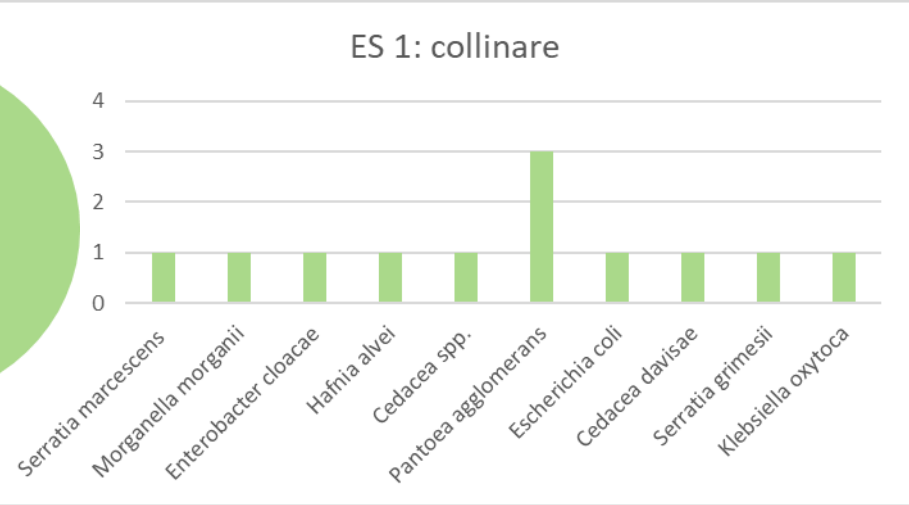
20 BEEC



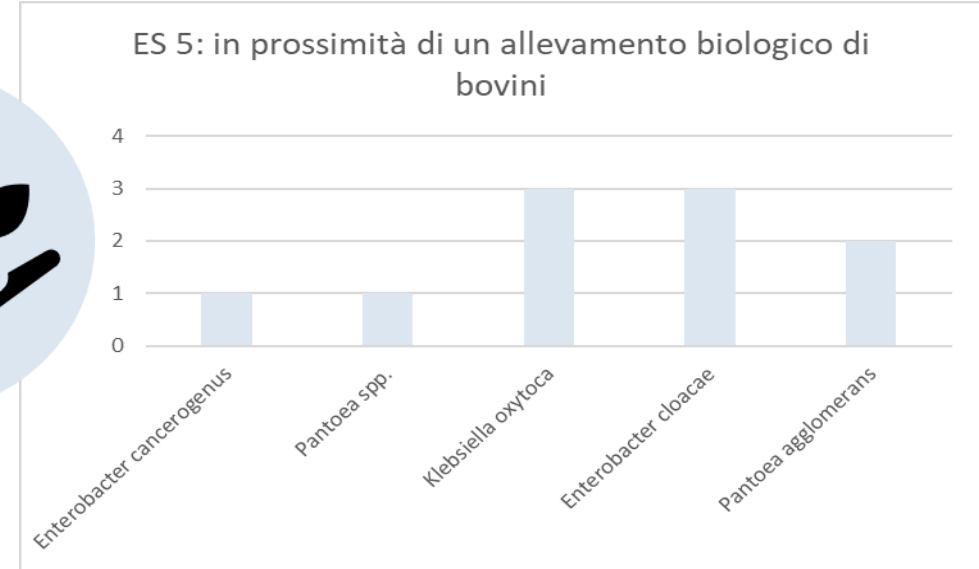
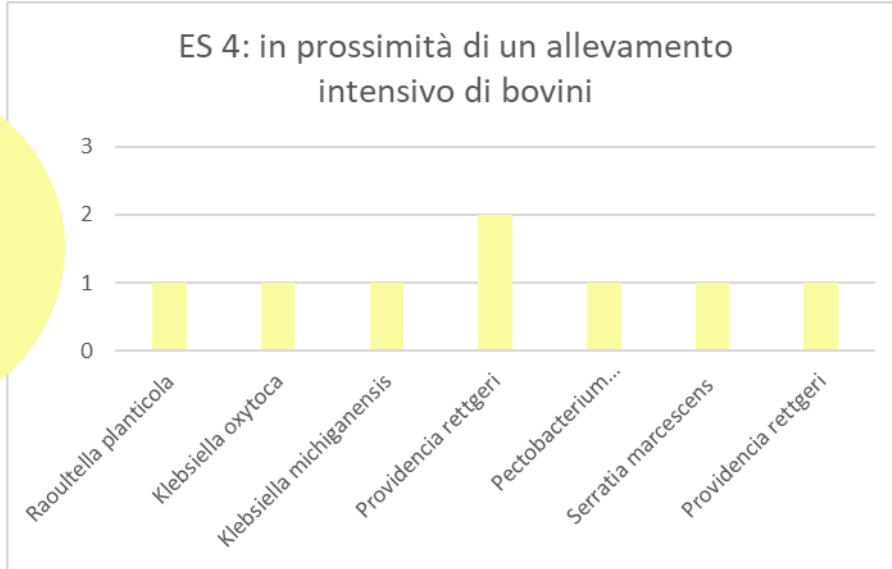
Enterobacteriaceae isolate da
19 BEEC



Risultati e discussioni



Risultati e discussioni



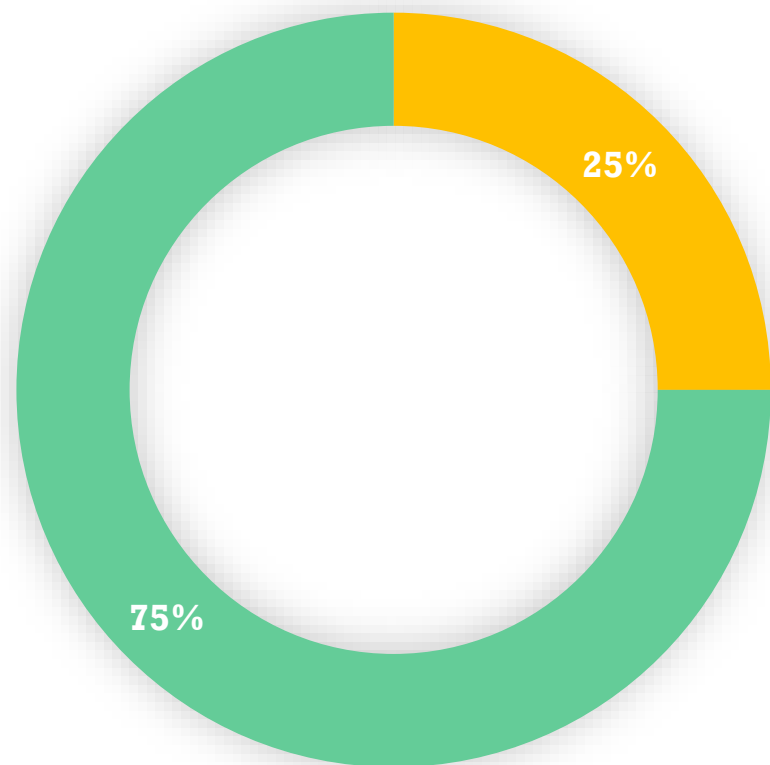
Klebsiella oxytoca

→ specie batterica maggiormente isolata e rinvenuta in tutti e 5 i siti

Hafnia alvei

→ batterio affine alle api, rinvenuto nel sito collinare (ES 1)

Risultati e discussioni



- % ceppi R ad almeno 1 antibiotico
- % ceppi S

Antimicrobico	Numero di ceppi R (esclusa resistenza intrinseca)
AMP	4
AMC	8
CZ	1
CAZ	1
TE	1
IMP	0
ENR	0
AK	1
SXT	0

Risultati e discussioni

Isolati resistenti						
Antimicrobico	ES 1	ES 2	ES 3	ES 4	ES 5	TOT
AMP		<i>B. quercina</i> (1); <i>C. neteri</i> ^a (1)		<i>K. michiganensis</i> ^b (1); <i>P. carotovorum</i> ^c (1)		4
AMC	<i>Cedecea</i> spp. (1)	<i>K. oxytoca</i> (2); <i>C. neteri</i> ^a (1)	<i>K. oxytoca</i> (1)	<i>K. michiganensis</i> ^b (1); <i>P. carotovorum</i> ^c (1); <i>K. oxytoca</i> (1)		8
CZ		<i>C. neteri</i> ^a (1)				1
CAZ					<i>E. cancerogenus</i> (1)	1
TE	<i>H. alvei</i> (1)					1
IPM						
ENR						
AK			<i>E. coli</i> (1)			1
SXT						
R/tot (%) *	2/12 (16,6%)	4/12 (33,3%)	2/7 (28,6%)	3/7 (42,8%)	1/10 (10%)	16/48 (33,3%)



ANALISI STATISTICA
PRISM 5.0 software
P<0,05

**Nessuna
differenza statisticamente
significativa**

Risultati e discussioni



ANALISI STATISTICA
PRISM 5.0 software
 $P < 0,05$

Statisticamente significativa

Tabella 39. Primi 30 principi attivi per numero (valore assoluto) di segnalazioni nel 2016 Aifa, 2016.

Rango	Farmaco	N. segnalazioni 2016	Incidenza (su schede da farmaci)	Δ % 16-15	%gravi
1	Warfarin	1.641	4,1%	-21,2%	45,2%
2	Acido Acetilsalicilico	1.254	3,1%	-6,8%	49,8%
3	Amoxicillina/Acido Clavulanico	1.120	2,8%	-30,4%	37,3%
4	Paclitaxel	944	2,3%	39,6%	35,2%
5	Ribavirina	793	2,0%	5,7%	29,4%

Foti et al. *Avian Res* (2017) 8:26
DOI 10.1186/s40657-017-0085-2



Avian Research

RESEARCH

Open Access



Antibiotic resistance assessment
in bacteria isolated in migratory Passeriformes
transiting through the Metaponto territory
(Basilicata, Italy)

Maria Foti^{1*}, Antonietta Mascetti¹, Vittorio Fisichella¹, Egidio Fulco², Bianca Maria Orlandella¹
and Francesco Lo Piccolo¹



R di origine ambientale

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
Volume 10, Number 12, 2013
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/fpd.2013.1552



Enterobacter and *Klebsiella* Species Isolated from Fresh
Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically
Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents

María Pilar Falomir, Hortensia Rico, and Daniel Gozalbo

Risultati e discussioni

Isolati resistenti						
Antimicrobico	ES 1	ES 2	ES 3	ES 4	ES 5	TOT
AMP		<i>B. quercina</i> (1); <i>C. neteri</i> ^a (1)		<i>K. michiganensis</i> ^b (1); <i>P. carotovorum</i> ^c (1)		4
AMC	<i>Cedecea</i> spp. (1)	<i>K. oxytoca</i> (2); <i>C. neteri</i> ^a (1)	<i>K. oxytoca</i> (1)	<i>K. michiganensis</i> ^b (1); <i>P. carotovorum</i> ^c (1) <i>K. oxytoca</i> (1)		8
CZ		<i>C. neteri</i> ^a (1)				1
CAZ					<i>E. cancerogenus</i> (1)	1
TE	<i>H. alvei</i> (1)					1
IPM						
ENR						
AK			<i>E. coli</i> (1)			1
SXT						
R/tot (%) *	2/12 (16,6%)	4/12 (33,3%)	2/7 (28,6%)	3/7 (42,8%)	1/10 (10%)	16/48 (33,3%)



Situazione in Italia

Come già accennato, le api sono considerate dalla legislazione europea animali produttori di alimenti, pertanto il miele deve rispondere alla legislazione vigente in materia di residui di molecole farmacologiche. In assenza di LMR definiti in tale matrice per gli antibiotici in Italia, tenuto conto del parere del Consiglio Superiore di Sanità del 13 febbraio 2008¹, sono adottate le concentrazioni o limiti di rilevanza di seguito riportati, che rappresentano le prestazioni minime che i laboratori devono garantire nell'ambito delle attività di controllo.

Gruppo/Molecole	Limite rilevanza (screening)	Limite rilevanza (conferma)
Sulfamidici	10 µg/kg	5 µg/kg
Tetracicline	10 µg/kg	5 µg/kg
Streptomicina	5 µg/kg	5 µg/kg
Tilosina	5 µg/kg	5 µg/kg

**Parere n. 16 del 30 Novembre 2016
(Ministero della Salute).**

Non produttore di ESBL

R di origine non ambientale

Perché usare antimicrobici in apicoltura?

ANTIMICROBICI

USA e alcuni Paesi UE: consentiti, ma strettamente regolamentati.

Italia: vietati.



Gruppo/Molecole	Limite rilevabilità (screening)	Limite rilevabilità (conferma)
<i>Sulfamidici</i>	10 µg/kg	5 µg/kg
<i>Tetraciline</i>	10 µg/kg	5 µg/kg
<i>Streptomicina</i>	5 µg/kg	5 µg/kg
<i>Tilosina</i>	5 µg/kg	5 µg/kg

TRATTAMENTO PESTE AMERICANA



Paenibacillus larvae, Gram+, bacillo sporigeno, colpisce la covata dell'alveare, denuncia obbligatoria (Regolamento Polizia Veterinaria).

TRATTAMENTO COLPO DI FUOCO BATTERICO

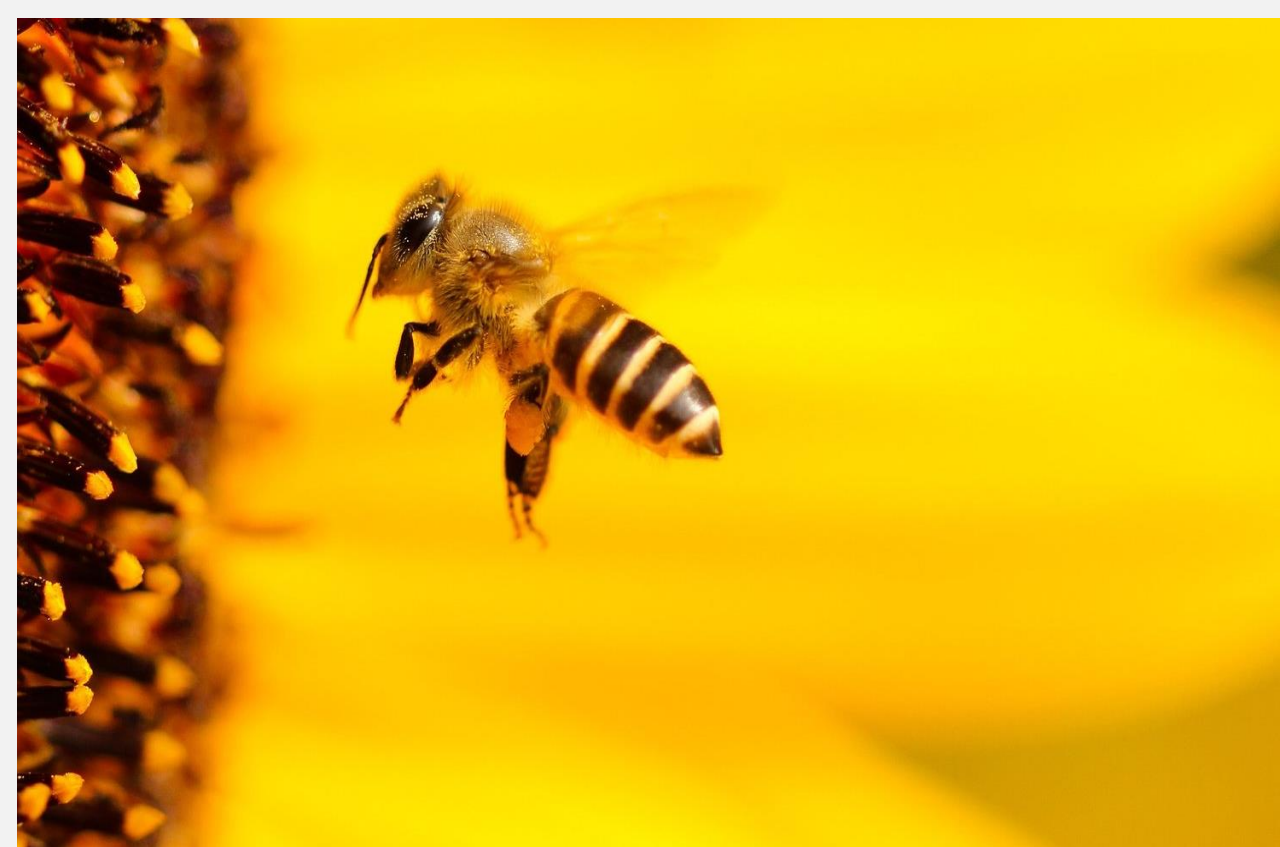


Erwinia amylovora, Gram-, Enterobacteriaceae, colpisce piante di Rosacee (pero, melo, nespolo).

Risultati e discussioni



Possibile ruolo dell'ACQUA come
fonte di contaminazione e di
trasmissione di batteri antimicrobico-
resistenti



Conclusioni

Necessità di implementare le misure di controllo dell'AMR in ambito umano, animale e ambientale mediante l'approccio One Health

- Ampio scenario di specie di batteriche inaspettate
- Maggior numero di R ad AMC, antimicrobico non impiegato in apicoltura ma più prescritto in Italia



**APE COME INDICATORE AMBIENTALE DI
ANTIBIOTICO-RESISTENZA**



Grazie per l'attenzione

Hunedoara, Romania 2018.