



UNIVERSITÀ DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
“SCIENZE MEDICO-VETERINARIE”

CICLO XXX

Caratterizzazione di *Escherichia coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ES β L) nella filiera suina e produzione di biofilm.

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Attilio Corradi

Tutore:

Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Dottorando: Elena Barilli

Anni 2014/2017

Indice

- ✓ Riassunto
- ✓ Introduzione
- ✓ Cap. 1- *Escherichia coli*, lo stato dell'arte
 - 1.1- Aspetti clinici nell'uomo
 - 1.2- Aspetti clinici nel suino: le colibacillosi
- ✓ Cap. 2- Antibioticoresistenza: il quadro generale
- ✓ Cap. 3- Batteri Gram negativi produttori di β -lattamasi a spettro esteso
- ✓ Cap. 4- Geni di resistenza di tipo ES β L: *bla*CTX-M
- ✓ Cap. 5- Geni di resistenza di tipo ES β L: *bla*SHV
- ✓ Cap. 6- Geni di resistenza di tipo ES β L: *bla*TEM
- ✓ Cap. 7- *Escherichia coli*: resistenza agli antibiotici e produzione di ES β L
 - 7.1- *E. coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso
- ✓ Cap. 8- Controllo della resistenza agli antibiotici nella filiera suina: le linee guida
- ✓ Cap. 9- Il biofilm in *Escherichia coli*: caratteristiche e implicazioni sanitarie
- ✓ Cap. 10- Materiali e metodi
- ✓ Cap. 11- Risultati
- ✓ Cap. 12- Discussione
- ✓ Conclusioni e prospettive future
- ✓ Bibliografia

Riassunto

Escherichia coli è un batterio Gram negativo, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, che si ritrova comunemente nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali e si comporta da commensale. Numerosi ceppi possiedono o possono acquisire fattori di virulenza e di resistenza in grado di determinare forme patogene nell'uomo e negli animali. *Escherichia coli* è anche un batterio ubiquitario, con un'elevata capacità di sopravvivenza nell'ambiente esterno, e la diffusione ambientale avviene attraverso la contaminazione fecale (Poolman JT, 2017; Martelli et al, 2013).

Gli *Escherichia coli* commensali sono una delle specie monitorate per la diffusione dell'antibiotico resistenza, un fenomeno di primaria importanza in quanto determina l'inefficacia dei trattamenti terapeutici antibiotici con un aumento dei decessi e dei costi della sanità (ECDC/EFSA/EMA,2017).

La resistenza agli antibiotici in *E. coli* si traduce in un aumento della diffusione e della persistenza di patologie infettive nell'uomo, in particolare di origine ospedaliera, come infezioni del tratto urinario e della cute, ma anche in ogni settore della veterinaria. Inoltre, *Escherichia coli* rappresenta uno dei principali vettori di geni di resistenza, localizzati su elementi genetici mobili, come plasmidi e trasposoni (Tal et al, 2015; Carattoli A, 2008). L'elevata capacità di trasmissione dei geni di resistenza è anche mediata dalla possibilità da parte di *E. coli* di persistere nell'ambiente e sulle superfici, attraverso la formazione di comunità cellulari complesse dette biofilm (Ranjith et al, 2017).

Il monitoraggio di questo microorganismo riguarda in particolar modo la resistenza verso le cefalosporine di III generazione, che risultano inattivate dalla produzione di enzimi, detti β -lattamasi a spettro esteso (ESBL): sono stati identificati tre famiglie principali, codificate dai geni *bla*CTX-M, che attualmente risulta prevalente nella popolazione batterica sia in Europa sia in Italia, *bla*TEM e *bla*SHV (EFSA, 2011).

L'elevata capacità di trasmissione dei geni di resistenza è anche mediata dalla possibilità da parte di *E. coli* di persistere nell'ambiente e sulle superfici, attraverso la formazione di comunità cellulari complesse dette biofilm (Ranjith et al, 2017).

Nel presente lavoro di tesi sono stati analizzati 500 campioni provenienti dalla filiera suina (feci, carcasse, alimenti), in cui sono stati isolati ceppi di *E. coli*, successivamente indagati per valutare le resistenze alle cefalosporine di III e IV generazione sia a livello fenotipico sia mediante PCR Real Time, andando a rilevare la prevalenza dei geni di resistenza. Inoltre è stata indagata la capacità dei ceppi positivi per ESBL di produrre biofilm *in vitro* e mediante valutazione della minima concentrazione inibente è stato saggiato un pannello di antibiotici (EUCAST) per determinare la presenza di multi-resistenza.

Introduzione

La sanità pubblica mondiale ha posto l'attenzione sulla diffusione del fenomeno dell'antibiotico resistenza (AMR, antimicrobial resistance), cioè la capacità di diversi microrganismi di resistere all'azione di un antibiotico, con conseguente inefficacia del trattamento terapeutico e persistenza dell'infezione (WHO, 2014). È stato dimostrato che la resistenza agli antimicrobici è causa di un aumento dei costi economici e sociali, ma soprattutto, di 25.000 decessi all'anno nell'Unione Europea e si stima che la cifra possa superare i 700.000 casi all'anno (EFSA, 2017).

In medicina umana, la resistenza agli antimicrobici è un problema diffuso sia nella cittadinanza sia nell'ambito ospedaliero e può riguardare infezioni comuni (cistiti, uretriti, infezioni a carico della cute) e infezioni più complesse (meningiti, polmoniti, pielonefriti) (Crivaro et al, 2015; EFSA, 2011).

In medicina umana e veterinaria il problema è analogo e l'uso degli antibatterici, sia a scopo terapeutico sia a scopo preventivo, ha contribuito alla selezione e alla diffusione di ceppi batterici resistenti alla maggioranza delle famiglie antibiotiche a disposizione. Il fenomeno è anche complicato dalla ridotta disponibilità di nuovi antibiotici (EFSA, 2017; Tang et al, 2014).

Nell'ultima decade è stata evidenziata la comparsa di resistenze verso antibiotici di importanza critica, appartenenti in particolare alla famiglia dei β -lattamici, che vengono inattivati da specifici enzimi, le β -lattamasi, prodotte in particolare da batteri Gram negativi. Questi enzimi comprendono le β -lattamasi a spettro esteso (ES β L), che conferiscono resistenza verso una varietà di antibiotici β -lattamici, incluse le penicilline, le cefalosporine di 2°, 3° e 4° generazione e i monobattamici (aztreonam) (Mathers et al 2015; Smet et al, 2010). Le ES β L sono codificate da plasmidi, ovvero elementi genetici mobili, identificati soprattutto in *Escherichia coli*.

E. coli alberga nell'intestino dell'uomo e degli animali e nell'ambiente, comportandosi prevalentemente da commensale, ma può provocare l'insorgenza di forme infettive complicate dalla

resistenza agli antibiotici, in particolare infezioni al tratto genito urinario, sia nell'uomo sia negli animali (Mathers et al 2015; Livermore DM, 2008). L'importanza di *E. coli* nella diffusione della resistenza agli antibiotici, in particolare mediata dalle β -lattamasi, è legata alla sua diffusione nell'ambiente e alla capacità di scambiare con altri batteri elementi genetici mobili (plasmidi e trasposoni), vettori di geni di resistenza. In Europa, attualmente l'ES β L maggiormente diffusa è l'enzima CTX-M, seguito dagli enzimi TEM e SHV, che rappresentano le tre principali famiglie di ES β L (Buelow et al, 2017; WHO, 2014).

La persistenza e la diffusione di resistenze antibiotiche da parte di *E. coli* è facilitata non solo dall'ubiquità del patogeno, ma anche dalla notevole resistenza nell'ambiente e dalla capacità di numerosi ceppi di formare comunità complesse di batteri, anche di diversa specie, definite biofilm. La presenza di biofilm su numerose superfici riguarda sia l'ambiente esterno (suolo, impianti idrici), sia l'ambiente ospedaliero e la catena alimentare, dove l'uso di antibiotici e di trattamenti di sanificazione e disinfezione, hanno favorito la selezione di microrganismi patogeni altamente resistenti (Ranjith et al, 2017).

Cap. 1- *Escherichia coli*, lo stato dell'arte

Escherichia coli è la principale specie batterica del genere *Escherichia*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il genere comprende cinque specie, differenziabili sulla base delle caratteristiche biochimiche, ma la più conosciuta e studiata è *Escherichia coli*, identificata per la prima volta nel 1885 dal pediatra Theodor Escherich (Donnenberg MS, 2013). Si tratta di un comune abitante del tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali e si comporta generalmente da commensale, ma numerosi ceppi possiedono o possono acquisire fattori di virulenza e di resistenza in grado di determinare forme patogene nell'uomo e negli animali. *Escherichia coli* risulta essere un batterio ubiquitario, rilevabile facilmente nell'ambiente: la diffusione ambientale avviene prevalentemente attraverso la contaminazione fecale e mostra un'elevata capacità di sopravvivere facilmente nell'ambiente esterno (Donnenberg MS, 2013; Martelli et al, 2013).

E. coli comprende batteri di forma bastoncellare, con dimensioni di 0,5-1,5 x 1,0-3,0 µm, Gram negativo e non sporigeno. Si tratta di batteri prevalentemente mobili, per la presenza di strutture filamentose (flagelli peritrichi) che crescono con facilità in un ampio range di temperature (15-45° C), con un optimum di crescita a 37° C, e si comporta da aerobio facoltativo (Poolman JT, 2017). Possiede un metabolismo di tipo respiratorio e fermentativo: fermenta glucosio, lattosio e altri zuccheri, con abbassamento del pH e produzione di gas. Il pH rappresenta un importante fattore di crescita batterica e il valore ottimale è intorno a 6, anche se l'intervallo di tolleranza va da 4 a 9. Anche l'attività dell'acqua (aw) interviene nella sopravvivenza del batterio e valori inferiori a 0,95 ne rallentano la crescita (Poolman JT, 2017). *Escherichia coli* è, inoltre, ossidasi negativo, catalasi positivo, rosso-metile positivo, ureasi negativo e determina una reazione negativa alle prove con citrato e lipasi e alla formazione di acido solfidrico (Donnenberg MS, 2013). È in grado di degradare nitrati e nitriti e di fermentare mannosio, arabinosio, maltosio, mannite, ramnosio e xilosio. Queste

caratteristiche sono comuni a tutta la specie ed esistono minime variazioni tra i sierotipi. Per esempio, gli *E. coli* commensali sono generalmente in grado di fermentare il sorbitolo, al contrario degli *E. coli* O:157 (verotossici). I due gruppi sono differenziati anche dalla capacità dei primi di produrre l'enzima β -glucuronidasi (Donnenberg MS, 2013). Nei più comuni terreni di coltura, gli *E. coli* crescono formando colonie lisce, leggermente convesse, di colore grigiastro, a superficie lucida e bordi netti (fase S) oppure rugose e asciutte (fase R). Talvolta è possibile rilevare colonie di aspetto intermedio oppure mucoide (Poolman JT, 2017).

E. coli è sensibile all'azione di numerosi disinfettanti, quali sali quaternari di ammonio e gluteraldeide, ma l'efficacia dei presidi disinfettanti può essere ridotta a seguito della incompleta rimozione del materiale organico, che favorisce la sopravvivenza del patogeno nell'ambiente (Martelli et al, 2013).

Escherichia coli, in quanto appartenente al gruppo dei Gram negativi, è caratterizzato da una membrana esterna composta da un lipopolisaccaride (o LPS), comprendente un polisaccaride O (antigene somatico), un *core* polisaccaridico, comune a tutte le *Enterobacteriaceae*, e un lipide A che agisce come endotossina (Donnenberg MS, 2013). Il periplasma è costituito da un singolo strato di peptidoglicano, che presenta una tipica struttura a subunità, con un legame tra l'acido N-acetilmuramico e l'acido L-alanin-D-glutamico, l'acido meso-diaminopimelico e la d-alanina. Questi batteri sono inoltre provvisti di strutture filamentose, che intervengono nei meccanismi di adesione alle cellule, definiti fimbrie o pili, prevalentemente di tipo 1 (Sarkar et al, 2014).

Gli antigeni posseduti da *E. coli* sono compresi in 3 principali gruppi, che ne permettono la classificazione sierologica: il polisaccaride somatico (O, termostabile), l'antigene capsulare (K, di natura proteica e polisaccaridica e termolabile) e l'antigene flagellare (F, di natura proteica e termolabile). Lo studio delle strutture antigeniche ha permesso di identificare, a partire dal 1985, 186 antigeni O e 53 antigeni H, con varie combinazioni (Fratamico et al, 2016; Donnenberg MS, 2013).

Sulla base della diversità degli antigeni O è stata definita la classificazione sierologica di *E. coli* a partire al 1940, attuata da Kauffman, e successivamente ampliata da Ørskov et al (1977), con

definizione di uno schema di classificazione basato sulla presenza dei 3 principali antigeni di superficie (O, H, K) (Fratamico et al, 2016). Il gene che codifica per l'antigene O si trova a livello cromosomiale (gene cluster antigene O, O-AGG), la cui dimensione e composizione genetica sono estremamente variabili, a seguito di mutazioni o inserimenti di sequenze, determinando, quindi, una grande diversità antigenica (Iguchi et al, 2015; Sarkar et al, 2014). Attraverso l'applicazione di indagini sierologiche e molecolari, sono stati definiti 53 antigeni flagellari H, determinati dal gene *fliC*, che codifica per le proteine strutturali dei flagelli (Kao et al, 2014). Le porzioni terminali del gene sono altamente conservate e la variabilità antigenica risiede nelle differenze amminoacidiche della regione centrale, che definisce la superficie esposta dei filamenti flagellari (Fratamico et al, 2016; Ørskov F e Ørskov I, 1984).

Un'ulteriore classificazione della specie *E. coli* considera la presenza di fattori di virulenza e il meccanismo patogenetico che possono manifestare (patotipi) (Poolman JT, 2017). La presenza di questi fattori, in concomitanza a condizioni esterne particolari, può determinare la comparsa di forme cliniche di gravità variabile sia nell'uomo sia negli animali. Ceppi virulenti di *E. coli* sono differenziabili da un punto di vista clinico in base all'epidemiologia e ai sintomi manifestati e in base ai fattori di virulenza posseduti. Attualmente si differenziano, in termini di localizzazione, in ceppi intestinali ed extraintestinali. L'European Centre for Diseases and Control (ECDC) classifica i patotipi in:

- *E. coli* produttori di tossine shiga-like (STEC) indicati anche come *E. coli* verocitotossici (VTEC) ed *E. coli* enteroemorragici (EHEC);
- *E. coli* enteropatogeni (EPEC);
- *E. coli* enteroaggregativi (EAEC);
- *E. coli* enteroinvasivi (EIEC);
- *E. coli* diffusamente aderenti (DAEC).

L'adesività è il principale fattore di virulenza che permette ai batteri di aderire alle cellule, prevalentemente dell'epitelio intestinale (microvilli e cripte), contrastando la peristalsi intestinale,

che ne determinerebbe la rimozione. Il meccanismo è definito dalla presenza di sottili filamenti superficiali, del diametro di 20-80 *Angstrom* e lunghi fino a 2 millimicron, detti pili o fimbrie (Stacy et al, 2014). Gli antigeni che costituiscono queste strutture sono detti adesine e sono composti da proteine termolabili e sono codificati sia a livello cromosomiale sia a livello di elementi genetici mobili (Sarkar et al, 2014). Questi fattori di virulenza comprendono il fattore di colonizzazione (CFA/I, CFA/II, CFA/III), le adesine aggreganti (AAF/I, AAF/II), pili a fasci (BfP), l'intimina, i pili P, le proteine *Ipa* (antigene plasmidico di invasione) e le fimbrie.

Anche la capacità di produrre tossine rientra tra i fattori di virulenza ed esistono diverse tipologie di tossine classificate in base al meccanismo d'azione e al bersaglio. Si possono considerare enterotossine termolabili (o LT), codificate prevalentemente da plasmidi, che determinano alterazione della peristalsi e dell'assorbimento intestinale, verocitotossine in grado di determinare alterazione della permeabilità e dell'integrità degli endoteli vascolari provocando edemi e sanguinamenti, e citotossine ad azione necrotizzante (CNF-I e CNF-II) coinvolte nello sviluppo di forme extra-intestinali (Bryan et al, 2015). Altri fattori di virulenza sono caratterizzati dal meccanismo di adesione e distruzione (AE, attaching/effacing), che comporta adesione e distruzione dei microvilli intestinali per rottura del citoscheletro, dalla produzione di aerobactina, in particolare da parte di *E. coli* ad azione sistemica e entero-invasiva, e dalla resistenza al complemento e alla fagocitosi (capsula K1, LPS, proteine *traT* e *iss*), attraverso alcune strutture di superficie, quali l'antigene capsulare e i lipopolisaccaridi di membrana (Poolman JT, 2017). Infine, alcuni ceppi di *Escherichia coli* possiedono sistemi di secrezione di tipo III, ovvero apparati composti da circa 20 proteine, in grado di alterare la secrezione della cellula ospite (Zhou et al, 2014).

1.1- Aspetti clinici nell'uomo

Gran parte dei ceppi di *E. coli* si comportano generalmente come saprofiti di numerosi esseri viventi e fanno parte della flora microbica dell'uomo, in cui rivestono un ruolo fondamentale, intervenendo

nell'omeostasi del tratto intestinale e nella digestione di numerose sostanze nutritive. Questi microrganismi possono determinare la comparsa di forme cliniche intestinali, comportandosi da patogeni opportunisti, e in particolari situazioni, come stati di immunodepressione, si può avere diffusione dei batteri a distretti extraintestinali o acquisizione di fattori di virulenza. Sia gli *Escherichia coli* patogeni sia i saprofiti possono essere trasmessi per via oro-fecale, attraverso cibo e acqua contaminati, e attraverso il contatto con persone, animali e ambiente portatori (Gomes et al, 2016).

Le manifestazioni cliniche più frequenti sono rappresentate dalle forme gastroenteriche associate a diarrea di gravità variabile e sono associate generalmente a ceppi a localizzazione esclusivamente o prevalentemente gastroenterica. Gli *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC) sono i principali agenti di queste forme diarroiche a trasmissione alimentare, attraverso l'ingestione di acqua e alimenti contaminati (Gomes et al, 2016). Dopo la fase di colonizzazione questi ceppi producono tossine (Lt e St) che alterano la peristalsi e il riassorbimento intestinale con sviluppo di diarrea acquosa (Madhavan et al, 2015). Le manifestazioni cliniche di questi ceppi sono fortemente sottostimate perché nella maggior parte dei casi non richiedono ospedalizzazione o l'esecuzione di indagini particolari. I ceppi enteropatogeni (EPEC) possiedono fattori di adesione ai microvilli intestinali, determinandone la distruzione, con conseguente malassorbimento, aumento della secrezione e diarrea persistente (Kao et al, 2014).

Gli *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC) sono il patotipo più comunemente coinvolto in forme gastrointestinali gravi conseguenti all'ingestione di alimenti contaminati come carne macinata di bovino, latte non pastorizzato, acqua e vegetali contaminati. Le manifestazioni cliniche comprendono diarrea variabile da forme acquose a coliti emorragiche con ipertermia e dolore addominale (Makvana et al, 2015). Questo patotipo è anche agente della sindrome emolitico-uremica (SEU) come complicanza (3-7% dei casi) nei bambini di età inferiore ai 10 anni con comparsa di anemia emolitica, trombocitopenia, insufficienza renale acuta con possibile evoluzione cronica e decesso. Questa forma

clinica è determinata dalla produzione da parte dei ceppi EHEC di verocitotossine (VT1 e VT2) ad effetto citopatico (Bryan et al, 2015).

Gli *Escherichia coli* enteroaggregativi (EAaggEC) sono batteri che tendono a formare aggregati e a stimolare la secrezione di muco, con formazione di biofilm batterico e adesione, mediante fattori fimbriali, a livello dell'intestino tenue. Nell'uomo, si determinano la comparsa di diarrea acquosa persistente con vomito e grave disidratazione che colpisce prevalentemente neonati (Chattaway et al, 2014).

Gli *Escherichia coli* enteroinvasivi (EIEC) sono patotipi a localizzazione intestinale, in particolare a livello del colon, con capacità di invasione, mediante distruzione dell'epitelio intestinale: le manifestazioni cliniche nell'uomo comprendono febbre, crampi e dolori addominali, diarrea acquosa e talvolta sanguinolenta.

I ceppi extra-intestinali (ExPEC, Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*) generalmente non determinano diarrea ma possono colonizzare l'intestino dell'uomo in forma del tutto asintomatica, fino a rappresentare il 20% dei ceppi degli *Escherichia coli* appartenente alla flora microbica. Questi ceppi possono causare forme cliniche sia in soggetti sani sia in soggetti immunocompromessi e l'incidenza aumenta con l'aumentare dell'età dei pazienti (Makvana et al, 2015).

Nei neonati i ceppi ExPEC sono agenti di forme di meningite neonatale, che colpisce nel primo mese di vita. La meningite è l'infiammazione delle meningi, ovvero delle membrane che rivestono il sistema nervoso centrale, a seguito di cause infettive o infiammatorie. La meningite neonatale da ExPEC è una forma batterica caratterizzata da essudato purulento, infiammazione perivascolare ed edema cerebrale (Wijetunge et al, 2015). L'incidenza è di 2-5 casi su 10.000 nascite, con tassi 10 volte superiori nei Paesi in di sviluppo. La mortalità può superare il 50% dei casi ed è legata a complicanze concomitanti come parti prematuri e peso inferiore alla normalità. Sono frequenti gravi conseguenze a carico del sistema nervoso centrale come idrocefalo, epilessia, ritardi psicomotori, paralisi e perdita dell'udito. L'infezione si trasmette dalla madre nel canale del parto o per infezione ascendente dal cordone ombelicale (onfalite), con conseguente batteriemia e localizzazione cerebrale

(Wijetunge et al, 2015). La setticemia, sostenuta da *Escherichia coli*, può essere una conseguenza sistemica di batteri localizzati nel tratto intestinale o urinario e si manifesta con gravi alterazioni circolatorie, ipoperfusione e ipotensione. Sono colpiti prevalentemente immunodepressi, sottoposti a trapianto, anziani e neonati e in questi pazienti la mortalità è elevata (Makvana et al, 2015). Uno studio condotto in Italia tra il 2006 e il 2010 ha identificato tra le principali forme di infezioni neonatali con un'incidenza del 44,4% di setticemie, del 28,8% di infezioni urinarie e del 25% di polmoniti sostenute nel 13,1% dei casi da *Escherichia coli* (Crivaro et al, 2015).

Le infezioni del tratto urinario (UTI, Urinary Tract Infection) sono attualmente la forma clinica sostenuta da *Escherichia coli* più diffusa nell'uomo. Le UTI sono diagnosticate prevalentemente nella popolazione femminile, ma anche nei neonati, negli anziani e nei soggetti sottoposti a cateterizzazione urinaria e sono diagnosticati fino a 150 milioni di casi all'anno, che si traducono in un notevole aumento dei costi per la sanità pubblica. Le UTI sono generalmente causate da ceppi uropatogeni, generalmente Gram negativi, in prevalenza *E. coli* (Sarkar et al, 2014). L'infezione del tratto urinario può avvenire attraverso tre vie: per via ascendente, per via ematogena e per via linfatica. La via ascendente è la più comune e inizia dall'infezione della regione periuretrale con successivo passaggio all'uretra, alla vescica e possibile evoluzione ascendente alle alte vie urinarie (uretere e rene) (Makvana et al, 2015). L'infezione del rene può esitare in pielonefrite e insufficienza renale acuta, conseguente alla risposta infiammatoria e al danno tubulare. Ulteriori evoluzione cliniche sono ascessi renali, batteriemie e prostatiti. Gran parte dei ceppi uropatogeni provengono dal tratto intestinale e la contaminazione avviene per contiguità anatomica (Sarkar et al, 2014). È rara la diffusione per via ematogena, mentre la via linfatica è limitata ad evidenze di laboratorio. Le infezioni del tratto urinario in soggetti non immunodepressi sono generalmente indicate con il termine di non complicate (Sarkar et al, 2014).

1.2- Aspetti clinici nel suino: le colibacillosi

Escherichia coli colonizza l'intestino della specie suina in modo del tutto asintomatico e rientra nella flora commensale di questa specie animale, della quale rappresenta l'1%, percentuale che a sua volta è composta da numerosi stipiti (Martelli et al, 2013). Le forme cliniche si possono manifestare in presenza di ceppi dotati di fattori di virulenza e di condizioni concomitanti (alimentazione, management, fase produttiva) che favoriscono l'insorgenza e la diffusione della forma infettiva (Fairbrother et al, 2005). In queste condizioni, l'equilibrio della flora intestinale si altera profondamente, determinando un aumento della percentuale di *Escherichia coli* e in particolare la selezione di stipiti patogeni. La proliferazione di *E. coli* avviene nell'intestino tenue con conseguente diffusione nell'ambiente attraverso le feci e persistenza del batterio fino a 11 settimane nell'ambiente esterno.

Tra le manifestazioni cliniche più importanti nell'allevamento del suino, si riconoscono le forme di diarrea neonatale e di diarrea post svezzamento, sostenute da ceppi enterotossici di *E. coli* (ETEC). La patogenicità di questi ceppi è legata alla capacità di produrre fattori di adesione (fimbrie), che favoriscono la colonizzazione dell'intestino, e alla produzione di enterotossine (STa, o tossina termostabile e LTa, o tossina termolabile) (Liu et al, 2014; Wang et al, 2011).

La diarrea neonatale colpisce generalmente i suinetti nella prima settimana di vita, per esposizione alla flora batterica materna, con manifestazioni cliniche comprendenti diarrea acquosa, grave disidratazione e morte, in assenza di adeguata terapia. Gli *Escherichia coli* producono fattori di adesione fimbriali, che permettono la colonizzazione del piccolo intestino, determinando un rallentamento della peristalsi, e la tossina STa che altera gli scambi acqua-elettroliti, determinando la comparsa di diarrea. La morbilità è estremamente variabile, dal 30% al 80%, e la mortalità può essere elevata nella nidiata (70%) (Martelli et al, 2013; Wang et al, 2011).

Anche la fase di svezzamento rappresenta un momento critico per l'insorgenza di problematiche enteriche nel suino, a seguito dei cambiamenti della suinicoltura moderna, che ha anticipato lo

svezzamento all'età di 3-4 settimane, rispetto ai tre mesi della condizione naturale. Durante questa fase si ha il passaggio da un'alimentazione a base di latte a un'alimentazione solida, con rallentamento dello sviluppo intestinale e un'alterazione dell'integrità della mucosa intestinale (riduzione del numero dei villi intestinali e aumento della profondità delle cripte), predisponendo alla colonizzazione di patogeni intestinali. Le forme diarroiche post svezzamento sostenute da ceppi ETEC si manifestano a seguito dell'infezione per via oro-fecale (Wang et al, 2011).

Altre forme cliniche associate a ceppi di *Escherichia coli* sono rappresentate dalla malattia degli edemi, dalla mastite e dalla diffusione sistemica dei batteri. La malattia degli edemi consegue alla colonizzazione da parte di ceppi edemigeni (EDEC), produttori di una particolare tossina shiga-like, la Stx2, e di uno specifico fattore fimbriale (F18) (Wu et al, 2015; Mattsson et al, 2008). I ceppi, che si trasmettono per via oro-fecale colonizzano l'intestino con produzione della tossina, che viene rapidamente assorbita per via sistemica, con danno all'endotelio vascolare e formazione di edemi diffusi (Ercoli et al, 2015).

Nella scrofa, sono frequenti forme infettive a carico delle mammelle sostenute da *E. coli* per contaminazione ambientale da parte del materiale fecale e conseguente contatto con la mammella.

Escherichia coli ad azione patogena extraintestinale (ExPEC) possono determinare la comparsa di patologie sistemiche, quali setticemie, meningite, artriti e polisierositi nel suino. Queste forme colpiscono prevalentemente soggetti immunodepressi o scarsamente immunizzati durante le prime fasi di vita. L'infezione avviene per via ombelicale, intestinale o respiratoria, con successiva diffusione sistemica attraverso il circolo ematico (Liu et al, 2014; Wang et al, 2011).

Cap. 2- Antibioticoresistenza: il quadro generale

Con il termine di antibiotico resistenza (AMR, antimicrobial resistance) si fa riferimento alla capacità di diversi microrganismi, in particolare i batteri, di resistere all'azione di un antibiotico, verso il quale originariamente erano sensibili, determinando l'inefficacia del trattamento terapeutico e la diffusione dell'infezione (WHO, 2014). I meccanismi alla base della comparsa di resistenza in un batterio sono differenziabili in tre tipi: intrinseci, acquisiti e adattativi (Hughes and Andersson, 2017; Zhou et al, 2015; Wieczorek and Osek, 2013). La resistenza intrinseca è l'insensibilità costituzionale, cioè determinata geneticamente, di una specie batterica e si manifesta in tutti i ceppi batterici di quella specie. La resistenza acquisita può avvenire attraverso mutazioni spontanee o trasferimento orizzontale di geni. La resistenza di tipo adattativo è un aumento transitorio della resistenza a seguito della stimolazione di un gene di resistenza da parte dello stesso antibiotico, ovvero l'interazione tra il batterio e l'antibiotico diventa il fattore scatenante la comparsa di resistenza verso sia quella molecola sia altre (Hughes and Andersson, 2017; Mukerji et al, 2017).

Nella maggior parte dei casi il fenomeno consegue a meccanismi acquisiti, a seguito di mutazioni o acquisizione di geni di resistenza, che determinano un'aumento della resistenza fenotipica indipendentemente dalle condizioni di crescita del batterio o alle caratteristiche genetiche possedute in precedenza (Arzanlou et al, 2017; Zhou et al, 2015). Risulta comunque evidente che i geni di resistenza acquisiti non sono sempre espressi a livello fenotipico e che l'ambiente circostante gioca un ruolo fondamentale nell'espressione della resistenza. Poiché possono coesistere diversi meccanismi di resistenza, rimane difficile capire fino in fondo quali intervengano nella manifestazione *in vivo* (Hughes and Andersson, 2017).

L'antibioticoresistenza è un problema in crescita nell'ambito della salute pubblica globale: la mancata efficacia di un trattamento antibiotico si traduce, infatti, nella diffusione delle forme infettive, che diventano più difficili da controllare, e in un prolungamento dei tempi di ricovero dei pazienti

ospedalizzati, con conseguente aumento dei costi economici e sociali (ECDC/EMEA, 2009). La resistenza agli antimicrobici è causa di 25.000 decessi all'anno nell'Unione Europea e nel mondo si stima che determini oltre 700.000 casi di decesso all'anno (EFSA, 2017). Inoltre, si prevede che nel 2050 la resistenza agli antibiotici sarà la principale causa di decesso. Il fenomeno ha un impatto anche sulla gestione economica della sanità pubblica: i costi per i trattamenti inefficaci e prolungati, in associazione alla perdita di produttività legata alla malattia, hanno determinato in Europa una perdita di 1,5 bilioni di euro (Commissione Europea, 2016).

In medicina umana, la resistenza agli antimicrobici è un problema diffuso sia nella cittadinanza sia nell'ambito ospedaliero e può riguardare sia infezioni comuni, che normalmente non costituiscono un problema serio per la salute dell'uomo, come cistiti ed uretriti, sia infezioni più complesse (meningiti, polmoniti, pielonefriti) (Crivaro et al, 2015; EFSA, 2011). Queste infezioni attualmente si caratterizzano per una bassa o nulla risposta ai trattamenti antibiotici, comportando rischi per la vita del paziente. Le infezioni del tratto genito-urinario (UTIs, urinary tract infections) sono le forme cliniche che maggiormente risentono della comparsa di forme di resistenza, in particolare nella popolazione femminile e nei pazienti ospedalizzati e cateterizzati (Costa et al, 2017; Rosa et al, 2107; Chin et al, 2106). Molte patologie infettive dei neonati e dei pazienti ricoverati in reparti di terapia intensiva, ma anche pazienti sottoposti a trattamenti chemioterapici o a trapianti, pertanto più vulnerabili alle forme infettive, hanno dimostrato un aumento drammatico della resistenza ai trattamenti antibiotici (Laxminarayan et al, 2013; Smith et al, 2013). Nell'ambito delle infezioni neonatali, sono stati isolati ceppi di *K. pneumoniae* (71%) e di *E. coli* (50%) resistenti alla gentamicina e ceppi di *K. pneumoniae* (40-60%) e di *E. coli* (70-100%) resistenti all'ampicillina (Waters et al, 2011).

In medicina umana e veterinaria, l'uso degli antibatterici è divenuto il cardine del trattamento e della prevenzione di numerose patologie: ciò ha contribuito alla selezione e alla diffusione di ceppi batterici resistenti alla maggioranza delle famiglie antibiotiche a disposizione (EFSA, 2017). A questo si associa una ridotta disponibilità di nuovi antibiotici. Infatti, lo sviluppo di molecole antibiotiche si è

avuto prevalentemente tra il 1940 e il 1980, ma nelle decenni successive si è assistito ad una progressiva riduzione dello studio e della sintesi di nuove molecole (Fig. 1 e Fig. 2) (Tang et al, 2014).

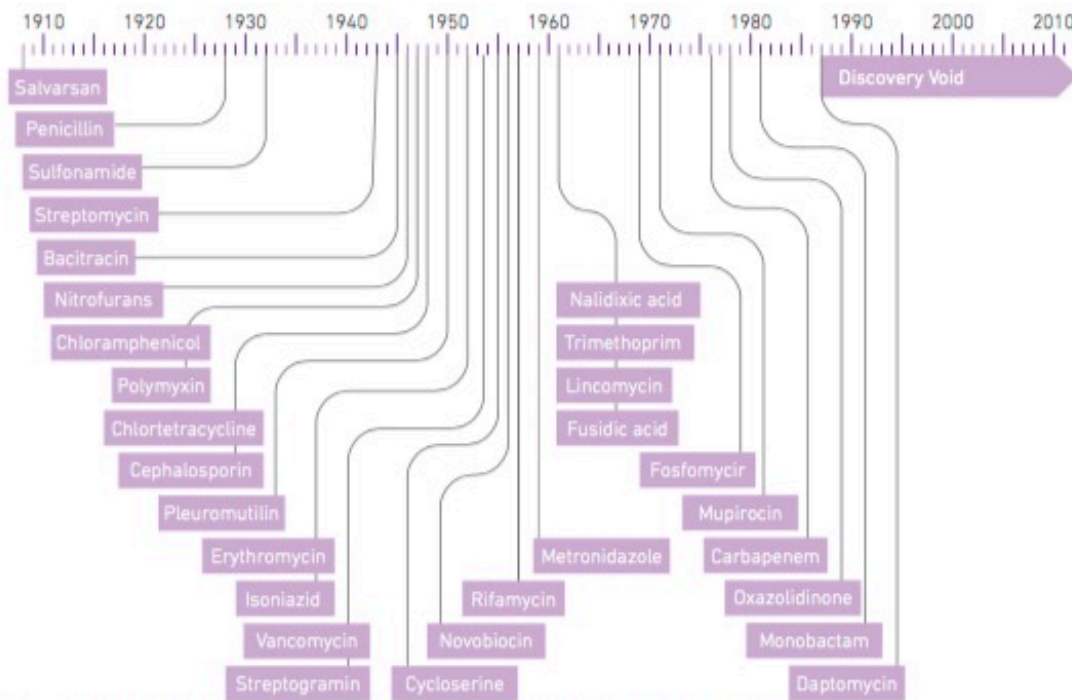


Fig. 1: Evoluzione dello sviluppo delle principali molecole antibiotiche (EFSA, 2017)

Per valutare la diffusione e l'incidenza del problema, numerosi Stati in Europa hanno attuato piani di sorveglianza nazionali dell'antibioticoresistenza sia in medicina umana sia in medicina veterinaria e piani di monitoraggio del consumo degli antimicrobici. La Direttiva 2003/99/CE sul monitoraggio delle zoonosi e degli agenti di zoonosi ha introdotto delle indicazioni generiche riguardo il monitoraggio e la registrazione delle resistenze antibiotiche in patogeni agenti di zoonosi, come *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., isolati dagli animali destinati alla produzione degli alimenti e negli alimenti stessi. In Europa è stato istituito a partire dal 2008 il sistema EARS-Net, coordinato dall'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), che coinvolge i 28 stati dell'Unione Europea con in aggiunta l'Irlanda e la Norvegia.

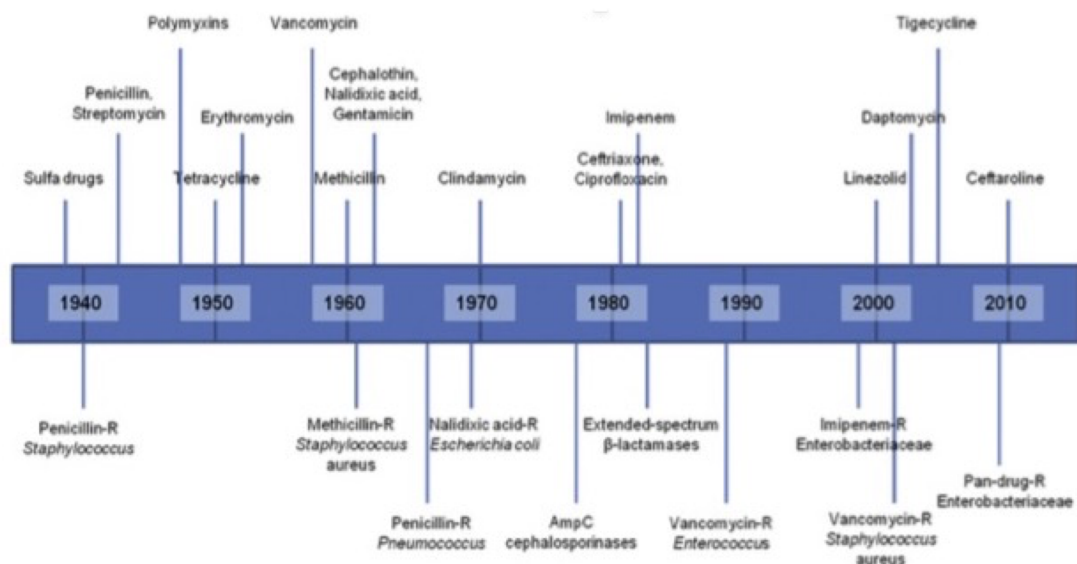


Fig. 2: Time-line della produzione delle molecole antibiotiche attualmente disponibili e comparsa delle relative resistenze (Tang et al, 2014).

Questo network, che ha permesso di mappare la situazione dell'AMR in Europa, include la sorveglianza della sensibilità agli antimicrobici di nove batteri sia commensali sia in grado di provocare gravi forme cliniche, come setticemie e meningiti. I batteri oggetto di monitoraggio comprendono (ECDC/EFSA/EMA, 2017):

- *Escherichia coli* commensali, monitorati per la resistenza verso le cefalosporine di terza generazione, determinata dalla produzione di β -lattamasi a spettro esteso (ES β L, Extended Spectrum β -Lactamases) e verso i fluorochinoloni;
- *Klebsiella pneumoniae* per la resistenza verso le cefalosporine di terza generazione, compresa la resistenza determinata dalla produzione di ES β L, e verso i carbapenemici;
- *Staphylococcus aureus* per la resistenza verso i β -lattamici, in particolare verso le meticilline (MRSA, Methicillin-resistant *S. aureus*);
- *Salmonella* spp. non tifoidee (NTS, nontyphoidal *Salmonella*) per la resistenza verso i fluorochinoloni;
- *Shigella* spp. per la resistenza verso i fluorochinoloni;

- *Neisseria gonorrhoeae* per la resistenza verso le cefalosporine di terza generazione

Specie	<i>Salmonella</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis/faecium</i>
Broiler	M, NCP, PHC	M, CSS	V	M, CSS	V
Ovaiole	M, NPC	-	-	-	-
Tacchini (ingrasso)	M, NCP, PHC	M, CSS	V	M, CSS	V
Bovini <1 anno	M, PHC	-	-	M, CSS	V
Suini (ingrasso)	M, PHC	-	-	M, CSS	V

Tabella 1: Monitoraggio dell'AMR nel 2014 come definito dalla Decisione 2013/652/EU (CSS: campioni cecali da animali sani al macello; NCP: Piano di controllo nazionale per *Salmonella*, M: monitoraggio obbligatorio; PHC: criterio di valutazione del processo di igiene; V: monitoraggio volontario) (EFSA, 2017).

Con la Decisione di Esecuzione 2013/652/CE, il sistema EARS-Net è stato affiancato dal Foodborne and Waterborne Diseases and Zoonoses Network (FWD-Net), coordinato dall'ECDC e dall'EFSA, che raccoglie informazioni sulla diffusione di AMR in batteri isolati dalla filiera alimentare, e la Decisione ha implementato la Direttiva 99/2003/CE, definendo nuove priorità del monitoraggio, concentrandosi su specifiche popolazioni di animali produttori di alimenti, in particolare il pollame, i suini e i vitelli, e prodotti alimentari (Tabella 1). Con l'implementazione, il monitoraggio delle resistenze in *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* e in *E. coli* commensali, isolati dai principali animali produttori di alimenti, è diventato obbligatorio (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

In linea con quanto definito dalla Direttiva 2003/99/EC, l'EFSA ha definito guide specifiche per il monitoraggio volontario delle resistenze in *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., in quanto agenti di zoonosi, e di *E. coli* ed enterococchi, come batteri indicatori di resistenze antibiotiche negli alimenti (ECDC/EFSA/EMA, 2017). In particolare, il monitoraggio degli *E. coli* commensali e di

Campylobacter spp. è previsto da isolati provenienti dalla raccolta di campioni cecali da carcasse di animali sani al macello (EFSA, 2008).

La valutazione delle resistenze riguarda pannelli di antibiotici definiti in base alla rilevanza e in rapporto ai trattamenti terapeutici utilizzati in medicina umana: in particolare sono oggetto di monitoraggio antibiotici di importanza critica (CIAs, critically important antimicrobials) in medicina umana o importanti per una determinata specie patogena o di rilevanza a fini epidemiologici (Fig. 3).

Il pannello degli antibiotici negli ultimi anni è stato ampliato includendo la colistina, il meropenem e il ceftazidime, di fondamentale importanza nella terapia umana e nella comparsa di meccanismi di resistenza (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

Substances	<i>Salmonella</i> spp.		<i>C. coli/C. jejuni</i>		Indicator <i>E. coli</i>		Enterococchi	
	-2013	2014-	-2013	2014-	-2013	2014-	-2013	2014-
Ampicillin	•	•			•	•	•	•
Azithromycin		•				•		
Cefotaxime	•	•			•	•		
Ceftazidime		•				•		
Chloramphenicol	•	•			•	•	•	•
Ciprofloxacin	•	•	•	•	•	•		•
Colistin		•				•		
Daptomycin								•
Erythromycin			•	•			•	•
Gentamicin	•	•	•	•	•	•	•	•
Linezolid							•	•
Meropenem		•				•		
Nalidixic acid	•	•	•	•	•	•		
Quinupristin/dalfopristin							•	•
Streptomycin				•			•	
Sulfonamides	•	•			•	•		
Teicoplanin								•
Tetracyclines	•	•	•	•	•	•	•	•
Tigecycline		•				•		•
Trimethoprim	•	•			•	•		
Vancomycin							•	•

Fig. 3: Lista degli antibiotici per i quali è stata valutata la resistenza in *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* commensali ed enterococchi nel biennio 2013-2014 (EFSA, 2017)

L'analisi dei fattori di rischio che hanno portato all'aumento dei casi di resistenza agli antibiotici è stato ed è tutt'ora oggetto di studio, anche in base alla specie batterica considerata. Una delle prime cause è rappresentata dalla trasmissione diretta di geni di resistenza mediante elementi genetici mobili (plasmidi) tra batteri sia della stessa specie sia di famiglie diverse (Zhou et al, 2015). Sono coinvolti prevalentemente batteri ubiquitari che si comportano da commensali, come *E. coli*: si tratta di batteri che si ritrovano diffusamente nell'ambiente esterno e possono essere facilmente trasmessi dal contatto con altri uomini, con l'ambiente, con gli alimenti contaminati e gli animali, in particolare quelli destinati alla produzione di alimenti (Jackson et al, 2015; Sunde et al, 2015).

È ormai noto che il consumo di antibiotici da parte degli animali, sia da compagnia che di interesse zootecnico, e da parte dell'uomo sono strettamente connessi al problema della AMR (Laxminarayan et al, 2013). Le classi di antibiotici utilizzate negli animali produttori di alimenti e in medicina umana sono essenzialmente le stesse e ciò ha contribuito alla selezione di microrganismi resistenti sia per riduzione della flora competitiva, sensibile a queste molecole, sia per sviluppo di mutazioni a seguito del contatto prolungato con l'antibiotico (Törneke et al, 2015). Questo aspetto è stato sottolineato in medicina veterinaria a seguito dell'uso di antibiotici a scopo preventivo o come promotori di crescita negli allevamenti, anche se questa pratica è stata utilizzata in Europa per molti anni ed è stata vietata a partire dal 2006, con il Regolamento CE n° 1831 del 2003, in tutta l'Unione Europea, ma rimane pratica comune in numerosi Stati extraeuropei (Laxminarayan et al, 2013).

In molti Paesi, la vendita di antibiotici utilizzati in medicina veterinaria (sia negli animali produttori di alimenti sia negli animali da compagnia) e in medicina umana risulta avere un grosso impatto economico. Nel 2014 sono state vendute 3.821 tonnellate di sostanze dotate di attività antimicrobica in medicina umana e 8.927 tonnellate in medicina veterinaria nei 28 Stati coinvolti nel monitoraggio del consumo degli antibiotici (ECDC/EFSA/EMA, 2017). Le classi maggiormente utilizzate in medicina umana nell'Unione Europea sono rappresentate da penicilline, macrolidi e fluorochinoloni, mentre per gli animali destinati alla produzione di alimenti risultano di principale utilizzo le tetracicline, le penicilline e i sulfonamidi (EFSA, 2017). L'uso di monobattamici e di carbapenemici

è attualmente vietato per gli animali produttori di alimenti. In Italia, il consumo di antibiotici in medicina umana è pari a 634 tonnellate mentre è pari a 1432 tonnellate negli animali produttori di alimenti (EFSA, 2017). I dati EFSA (2017) sul consumo di antimicrobici negli animali produttori di alimenti collocano l'Italia al terzo posto, dopo Cipro e la Spagna. Il consumo di cefalosporine di terza e quarta generazione nel 2014 è stato maggiore in medicina umana rispetto all'utilizzo in zootecnia: questa classe di antibiotici ha attività antibatterica sia su batteri Gram positivi sia negativi, compresi *E. coli* e *Salmonella* spp. e sono considerati antibiotici di importanza critica, ovvero da utilizzare per il trattamento di gravi infezioni nell'uomo (WHO, 2017).

Generalmente, gran parte degli antibiotici sono utilizzati nel comparto zootecnico per il trattamento di forme infettive comuni, come patologie enteriche e respiratorie soprattutto negli animali in accrescimento e mastiti nella bovina da latte, e i trattamenti possono essere somministrati sia individualmente sia come trattamento di massa. L'uso di molecole antibiotiche è diverso a seconda delle zone considerate, soprattutto in termini di disponibilità: in molte zone, in particolare in Europa, la somministrazione di un trattamento antibiotico deve avvenire a seguito di una prescrizione veterinaria soprattutto per quanto riguarda gli animali destinati alla produzione di alimenti, con specifiche restrizioni di utilizzo (Direttiva 2004/28/CE).

L'analisi della trasmissione di batteri resistenti tra animali e uomo è complessa e coinvolge diverse vie. In particolare, la resistenza può essere trasmessa da batteri commensali a batteri patogeni e tra specie diverse di commensali e ciò ne amplifica la complessità. Il rischio mediato dall'alimento è l'aspetto maggiormente studiato: gran parte dei batteri resistenti presenti nell'alimento di origine animale deriva da contaminazioni, in particolare durante la fase di eviscerazione in sede di macellazione o durante la fase di manipolazione, commercializzazione e di conservazione degli alimenti, anche in ambiente domestico (Laxminarayan et al, 2013). Di recente è stata associato il consumo di carne, contaminata da *E. coli* commensali resistenti, all'insorgenza di infezioni non sensibili agli antibiotici, a carico del tratto urinario delle donne (Manges AR, 2016; Jakobsen et al, 2012).

Anche il contatto diretto tra gli animali e l'uomo è considerato uno dei più importanti fattori di rischio nella diffusione del fenomeno della resistenza antibiotica. La trasmissione di MRSA dagli animali, in particolare suini, all'uomo è stata documentata da numerosi studi (Fischer et al, 2017; Reynaga et al, 2016; de Been et al, 2014; van Cleef et al, 2014). Nonostante gli studi, una prova evidente della trasmissione di geni di resistenza tra il microbiota degli animali e l'uomo è attualmente difficile da ottenere (Laxminarayan et al, 2013).

Cap. 3- Batteri Gram negativi produttori di β -lattamasi a spettro esteso

Nell'ultima decade sono state identificate oltre 400 diverse β -lattamasi, ma il numero è in continua crescita, soprattutto in batteri Gram negativi. Questi enzimi comprendono le β -lattamasi a spettro esteso (ES β L), le AmpC β -lattamasi, le metallo- β -lattamasi, le carbapenemasi e le oxacillinasi (Smet et al, 2010; Giske et al, 2009).

Le β -lattamasi a spettro esteso (ES β L) sono enzimi in grado di idrolizzare molecole della classe degli oxiamino- β -lattamici, come penicilline e cefalosporine, ma che possono essere inibiti da specifiche molecole attive verso le β -lattamasi, come l'acido clavulanico (Bush et al, 2010). Le ES β L sono codificate prevalentemente da plasmidi, identificati soprattutto in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, che conferiscono resistenza verso una varietà di antibiotici β -lattamici, incluse le penicilline, le cefalosporine II, III e IV generazione e i monobattamici (aztreonam) (Mathers et al 2015; Livermore DM, 2008). Generalmente, questi enzimi non conferiscono resistenza verso i carbapenemici e le cefamicine (es: cefoxitina) (Liebana et al, 2013; Paterson and Bonomo, 2005). I batteri produttori di ES β L sono frequentemente co- o multi-resistenti, cioè presentano resistenze verso altre classi di antimicrobici, quali fluorochinoloni, aminoglicosidi e trimethoprim-sulfametossazolo, per l'azione di meccanismi di resistenza associati, codificati sia a livello plasmidico sia cromosomico (Smet et al, 2010; Jacoby and Munoz-Price, 2005).

I β -lattamici AmpC, invece, sono cefalosporinasi codificate a livello cromosomico in numerosi batteri Gram negativi, compresi gli appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, ma recentemente sono stati identificati plasmidi vettori di geni codificanti per AmpC (Liebana et al, 2013). Questi enzimi conferiscono resistenze alle penicilline e alle cefalosporine di II e III generazione, alle cefomicine ma non alle cefalosporine di IV generazione (es: cefepime, cefquinome) e carbapenemici

(Tabella 2). In particolare gli AmpC determinano resistenza verso combinazioni di antibiotici β -lattamici con inibitori di β -lattamasi (es: acido clavulanico) (Endimiani et al, 2008). Le metallo- β -lattamasi (MBLs) sono, invece, in grado di idrolizzare tutte le β -lattamasi, fatta eccezione per l'aztreonam (Smet et al, 2010). Negli ultimi anni, un altro tipo di β -lattamasi, le carbapenemasi, sono risultate emergenti nella famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Bush et al, 2010; Walsh TR, 2008). La loro diffusione si sta dimostrando un serio problema per il trattamento di infezioni nell'uomo, perché idrolizzano tutti i β -lattamici, inclusi i carbapenemici e l'aztreonam, rendendo questi microrganismi del tutto resistenti ai trattamenti a gran parte dei trattamenti antibiotici disponibili (Doi et al, 2017; Nordmann et al, 2009). I ceppi produttori di carbapenemasi sono solitamente suscettibili solo alle polimixine (es: colistina), alla fosfomicina e presentano una sensibilità variabile alla tigeciclina, ma sono stati registrati frequenti casi di *Enterobacteriaceae* resistenti alla colistina (Zarkotou et al, 2010).

Classe antibiotica	Antibiotici	Attività ESβL	Attività AmpC
Penicilline	Penicillina G, Amoxicillina, Ampicillina, Piperacillina	+++	+++
Penicilline/inibitore b-lattamasi	Amoxicillina/ac. clavulanico, ampicillina/sulbactam	Attività inibita	Attività non inibita
Cefalosporine di I gen.	Cefazolina, Cefalexina, Cefalotina	+++	+++
Cefalosporine di II gen.	Ceftiur, Cefuroxime	++	++
Cefalosporine di III gen.	Cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone	++	++
Cefalosporine di IV gen.	Cefepime	++	-
Monobattamici	Aztreonam	++	++
Cefamicine	Cefoxitina, cefotetan	-	+++
Carbapenemici	Imipenem, meropenem, ertapenem	-	-

Tabella 2: Diversa capacità di idrolisi degli antibiotici da parte di ES β L/AmpC (EFSA, 2011)

Infine, è stata identificata un'ulteriore classe, indicata come classe D di β -lattamici (o oxacillinasi) che possono essere considerati enzimi a spettro esteso. Gli enzimi appartenenti a quest'ultima classe sono in grado di compromettere l'efficacia di penicilline e di cefalosporine di 4° generazione, come cefepime o cefpirome (Aubert et al, 2001).

L'ampio profilo di resistenza dei batteri che fa seguito alla produzione di β -lattamasi ES β L, soprattutto se associata alla produzione di carbapenemasi e di AmpC, rappresenta un grave problema in termini di salute pubblica (Doi et al, 2017; Pitout and Laupland, 2008): sono, infatti, in aumento sia infezioni comuni, sia infezioni già in trattamento o infezioni di origine ospedaliera causate da batteri resistenti a cefalosporine di 2°, 3° e 4° generazione, quali ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, cefopodoxime e aztreonam, che sono spesso somministrati come primo trattamento terapeutico per diverse infezioni, sia nei pazienti ospedalizzati che non (Ben-Ami et al, 2009; Rodriguez-Bano et al, 2008; Ben-Ami et al, 2006). Questa tendenza ha determinato la selezione di cloni multiresistenti, verso i quali, gli antibiotici classificati come di prima scelta per i trattamenti risultano generalmente inefficaci, con conseguente insuccesso terapeutico e aumento della morbilità, della mortalità e dell'incidenza dei costi (Schwaber and Carmeli, 2007; Ben-Ami et al, 2006). Gli ES β L sono diffusi a livello globale ed è stato stimato che la colonizzazione nell'uomo da parte di batteri appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* arrivi a coinvolgere almeno 1.5 bilioni di persone nel mondo (Woerther et al, 2013).

In Europa i livelli di batteri produttori di ES β L variano sensibilmente in base ai Paesi considerati: nei Paesi del nord Europa sono stati riscontrati livelli notevolmente più bassi rispetto al sud e all'est Europa. Per quanto riguarda Paesi extra-Europei, in Canada meno del 10% di *E. coli* e *K. pneumoniae* risultano resistenti alle cefalosporine di III e IV generazione, ma studi recenti evidenziano un costante aumento del problema. Anche in Australia e in Nuova Zelanda l'incidenza di *Enterobacteriaceae* produttrici di ES β L si attesta su valori intorno al 10-15% (Doi et al, 2017).

Enterobacteriaceae produttrici di ES β L, in prevalenza *E. coli*, sono comunemente isolate in Europa da animali destinati alla produzione di alimenti e negli alimenti derivati: il 90% dei tagli di carne avicola in Spagna nel 2010 sono risultati positivi ad *Escherichia coli* produttori di ES β L, con un aumento del 60% dal 2007 (EFSA, 2017).

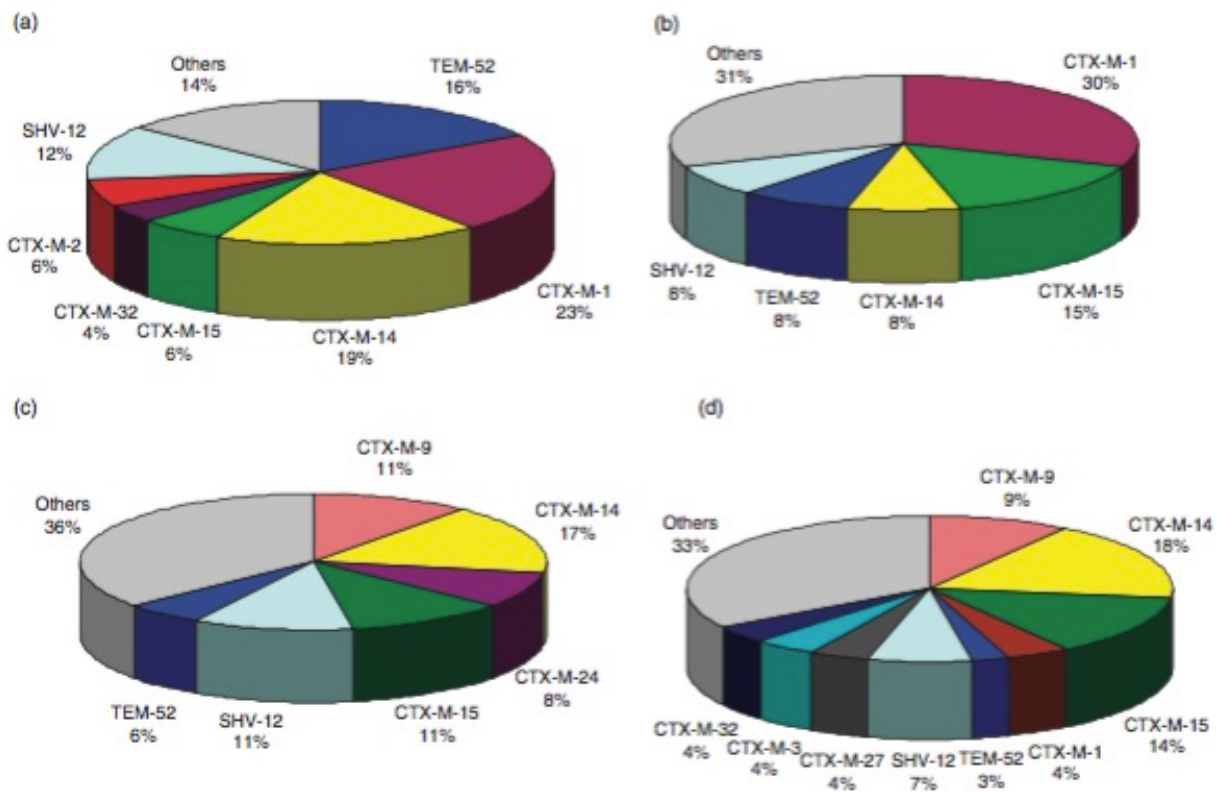


Fig. 4: Rappresentazione schematica della presenza di *Enterobacteriaceae* produttrici di ES β L isolate da animali sani (a), animali malati (b), uomini sani (c), uomini malati (d) (Smet et al, 2010).

In Olanda, uno studio condotto nel 2009 in tagli di carne confezionata ha mostrato l'incidenza dell'80% di *E. coli* produttori di ES β L in campioni di carne avicola e una percentuale inferiore in tagli di carne suina e bovina. Negli Stati Uniti in su tagli di carne avicola, suina e bovina nel 2012 è stata identificata una percentuale del 7% di *E. coli* ES β L (Mollenkopf et al, 2014).

Il riscontro di ES β L nell'uomo risale agli inizi del 1980, mentre la loro presenza negli animali è stata identificata la prima volta agli inizi degli anni 2000, pertanto le conoscenze acquisite riguardano prevalentemente la medicina umana (Tal et al, 2015). La diffusione di geni codificanti ES β L negli animali è recente e si pensa possano essere derivati da varianti provenienti dall'uomo (Hernández et al, 2005). Allo stesso tempo le β -lattamasi riscontrate nell'uomo sembrano avere origine dagli animali, come evidenziato da alcuni isolati di *Salmonella* Infantis e *S. Virchow* (Smet et al, 2010). Negli animali risulta esserci una predominanza della variante TEM-52, CTX-M-1 e CTX-M-14 nelle *Enterobacteriaceae* isolate a livello europeo (Fig. 4). Questi enzimi, insieme a CTX-M-9 e CTX-M-15, sono predominanti anche nei batteri isolati dall'uomo. Alcuni sono limitati a particolari Stati, come CTX-M-39 in Israele, CTX-M-13 in Cina e TEM-63 e TEM-131 in Sud Africa (Smet et al, 2010), e non sono stati rilevati negli animali. Gli enzimi che dimostrano una maggiore prevalenza in Europa sono: CTX-M-9, CTX-M-14 e SHV-12 in Spagna, CTX-M-14 e CTX-M-32 in Portogallo e CTX-M-1 in Francia e in Italia (EFSA, 2011).

Gli antibiotici della famiglia dei β -lattamici possono essere divisi in gruppi differenti, tre dei quali sono utilizzati nella pratica clinica in medicina veterinaria: le penicilline, le cefalosporine dalla I alla IV generazione e gli inibitori delle β -lattamasi (es: acido clavulanico). L'uso delle cefalosporine negli animali da reddito è solitamente consigliata per patologie gravi o resistenti ad altri trattamenti. Nel suino, in particolare, l'uso di alcune cefalosporine (ceftiofur) e di penicilline è indicato, come prima scelta, per il trattamento di enteriti necrotizzanti e patologie del tratto respiratorio (Smet et al, 2010). L'applicazione di piani di monitoraggio a livello europeo e mondiale ha definito il quadro dell'utilizzo dei β -lattamici in animali sia destinati alla produzione di alimenti sia non (Landers et al, 2012). Nei suini le aminopenicilline sono usate con frequenza, mentre le cefalosporine di seconda e terza generazione sono approvate come trattamenti di seconda scelta per varie patologie (Tal et al, 2015; Landers et al, 2012). La presenza di batteri produttori di ES β L in animali è in costante aumento ed è evidente come ciò si traduca in un impatto sulla salute pubblica. La resistenza, infatti, può essere

traferita mediante due meccanismi: ceppi resistenti ai β -lattamici, in prevalenza *Salmonella* spp. ed *E. coli*, possono essere trasferiti da un animale all'altro, a seguito di un contatto diretto, con anche la possibilità di sviluppare forme infettive (Carattoli A, 2008). Per quanto riguarda il trasferimento diretto della resistenza, l'uso di antibiotici, che selezionano i batteri resistenti, rimane il fattore più importante. Allo stesso tempo la resistenza può essere acquisita indirettamente mediante il trasferimento di geni di resistenza tra batteri di origine animale a batteri dell'uomo (Rubtsova et al, 2010).

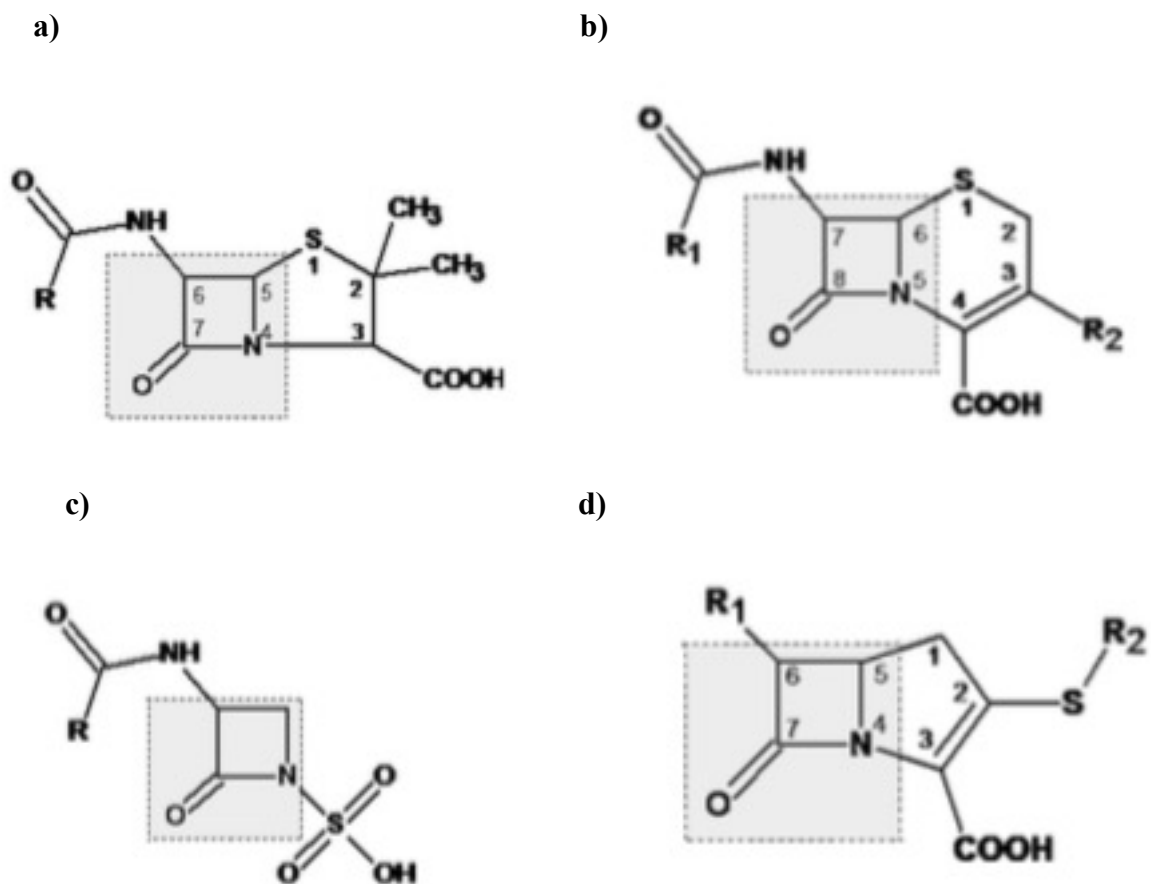


Fig. 5: Struttura dei principali gruppi di antibiotici β -lattamici: a) Penicilline; b) Cefalosporine; c) Monobattamici; d) Carbapenemi (Rubtsova et al, 2010).

Tutti i β -lattamici possiedono un anello β -lattamico, ovvero un anello a 4 atomi (tre atomi di carbonio e uno di azoto) che forma un'ammide ciclica (lattame), e sono divisi in base alla struttura chimica (Fig. 5). La loro azione principale è quella di prevenire la formazione della parete cellulare batterica interferendo con le fasi finali della sintesi del peptidoglicano (Fig. 6). Ciò avviene a seguito della penetrazione nella cellula batterica mediante canali porinici posti sulla membrana cellulare e successivamente agendo su specifiche strutture proteiche in grado di legarsi alle penicilline, dette "penicillin-binding proteins" (PBPs), il cui numero è variabile tra le diverse specie batteriche (Mathers et al 2015; Rubtsova et al, 2010).

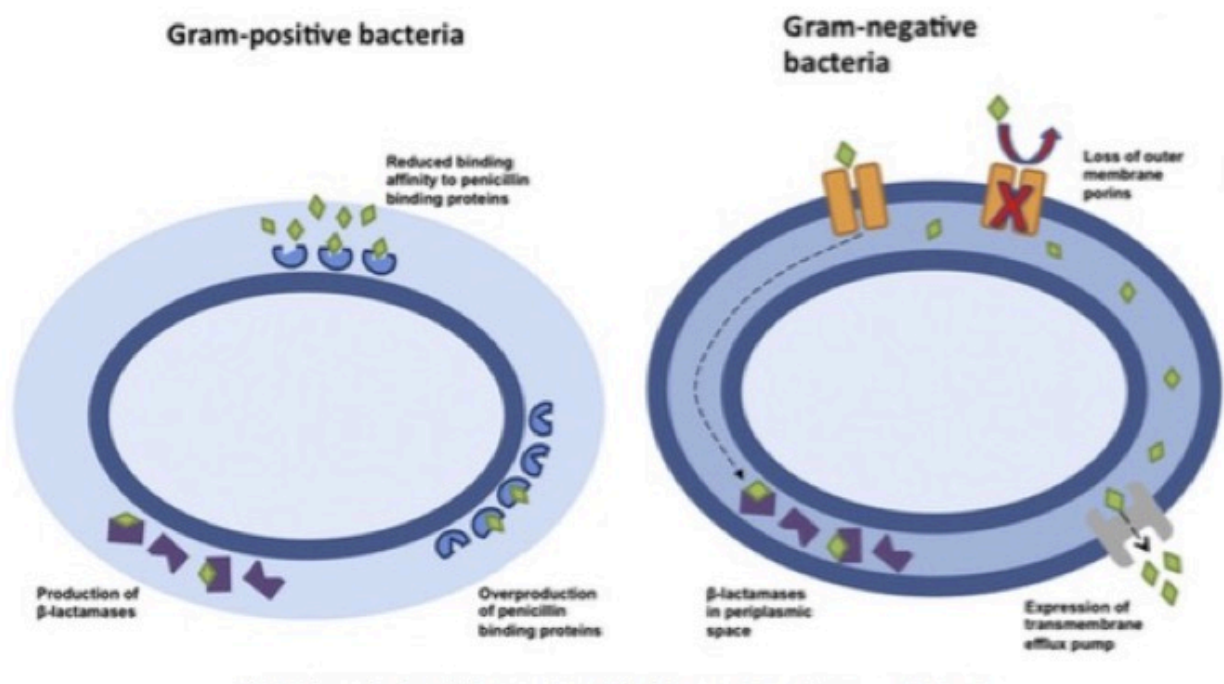


Fig. 6: Meccanismo d'azione dei β -lattamici in microrganismi Gram positivi e negativi (Tang et al, 2014).

Lo strato di peptidoglicano mantiene la struttura cellulare e protegge i batteri verso le forze osmotiche. Nei Gram positivi il peptidoglicano forma uno strato spesso attorno alla membrana citoplasmatica, mentre nei Gram negativi e nei micobatteri è sottile e posto tra la membrana esterna e la membrana

citoplasmatica (Smet et al, 2010). L'interazione che si viene a creare tra l'antibiotico β -lattamico e le PBP, basata sull'affinità tra il β -lattamico e il sito attivo della proteina, si traduce oltre che nell'alterazione della sintesi del peptidoglicano, nell'interruzione della replicazione cellulare e nella morte della cellula batterica (Rubtsova et al, 2010).

La resistenza dei Gram negativi verso i β -lattamici può essere dovuta a tre meccanismi: il primo consiste nella mutazione di geni codificanti per le PBPs, nell'acquisizione di nuove PBPs o la presenza di PBPs con strutture a mosaico. Tutti queste modifiche determinano un'alterazione delle proteine PBPs con conseguente riduzione dell'affinità da parte dei β -lattamici, mantenendo l'integrità della parete cellulare (Tang et al, 2014).

Il secondo meccanismo di resistenza verso i β -lattamici nella riduzione del target disponibile delle proteine PBPs. Nei Gram negativi le PBPs sono localizzate nello spazio periplasmatico e gli antibiotici β -lattamici devono attraversare la membrana esterna per poter raggiungere i siti bersaglio. Perciò ogni modifica che impedisce o limita (perdita di canali porinici) l'ingresso dei β -lattamici conferisce resistenza. Poiché questo meccanismo è condiviso da diverse molecole antibiotiche, si avrà una potenziale cross-resistenza a diversi antibiotici (Mathers et al 2015). L'ultimo meccanismo, che risulta essere il più comune, è la produzione di β -lattamasi, ovvero di enzimi in grado di inattivare questi antibiotici, prima che questi riescano a raggiungere le PBP (Tang et al, 2014; Rubtsova et al, 2010).

Storicamente alcuni batteri Gram negativi, in particolare *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, erano in grado di idrolizzare l'ampicillina, ma non le oxiamino-cefalosporine, in quanto produttori di due enzimi non ES β L, SHV-1 e TEM-1 (Falagas and Karageorgopoulos, 2009). Questi enzimi non-ES β L, a partire dal 1980, hanno mostrato mutazioni con l'acquisizione della capacità di idrolizzare anche le oxiamino-cefalosporine (Doi et al, 2017; Kliebe et al, 1985).

Gli ES β L maggiormente diffusi appartengono alle famiglie TEM, SHV e CTX-M e sono rilevabili nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, in particolari in *E. coli*, *K. pneumoniae* e in *Salmonella* spp.

I tre gruppi sono tutti costituiti dall'amminoacido serina nella parte centrale dell'enzima e hanno una massa molecolare pari a 29 kDa (Rubtsova et al, 2010). Questi enzimi sono codificati sia su plasmidi trasferibili sia a livello cromosomiale (Smet et al, 2010). Nel 1990 sono stati rilevati, in ospedali del Regno Unito, *E. coli* e *K. pneumoniae* produttori di ES β L di tipi SHV e TEM resistenti alle oxiamino-cefalosporine, con resistenza crociata ad altre molecole antibiotiche, in particolare gentamicina, ciprofloxacina e sulfametossazolo-trimethoprim (Wiener et al, 1999). Questa multiresistenza si è diffusa, soprattutto nell'ultima decade, sia l'uomo sia gli animali (EFSA, 2011).

Recentemente, sono stati identificate altre ES β L caratterizzate da una diffusione estremamente limitata: PER (*Pseudomonas* extended-resistant), VEB (Vietnam ES β L), BES (Brazil extended spectrum), GES (Guaiana extendend spectrum), TLA (Tlahuicas ES β L), SFO (*Serratia fonticola* ES β L) e IBC (integron-borne cephalosporinase) (Smet et al, 2010; Paterson et al, 2005). Inoltre, diversi β -lattamasi di tipo OXA, ovvero oxacillino-resistenti, che non sono solitamente in grado di idrolizzare le cefalosporine di III e IV generazione, presentano alcune eccezione per i tipi OXA-10 da OXA-13 a OXA-19 (Smet et al, 2010).

La capacità di produrre enzimi di tipo ES β L è determinata da una grande variabilità di geni, la cui diffusione e prevalenza sono variabili sia nell'uomo che negli animali (Tabella 3). Negli ultimi anni, diversi batteri produttori di β -lattamasi a spettro esteso di interesse in medicina umana sono stati isolati anche negli animali (Bortolaia et al, 2010). È interessante osservare che cloni produttori di ES β L sono stati isolati prevalentemente in Europa, mentre cloni produttori di AmpC sono stati rilevati soprattutto negli Stati Uniti (Doi et al, 2017). I geni più comunemente associati ceppi ES β L sono quelli codificanti per gli enzimi CTX-M, seguiti da TEM e SHV, in particolare quelli associati agli animali (Escudero et al, 2010; Carattoli A, 2009; Chiaretto et al, 2008). Batteri produttori di ES β L sono stati rilevati in numerosi animali produttori di alimenti (avicoli, suini, bovini, cavalli, conigli) e negli alimenti di origine animale. Da questi animali sono stati rilevati prevalentemente *E. coli*, Salmonelle non tifoidee e *K. pneumoniae* (Dierikx et al, 2010, Escudero et al, 2010; Carattoli A,

2008). In Europa la prevalenza di *Enterobacteriaceae* codificanti ES β L nel 2009 nei suini era estremamente variabile: nei Paesi dell'Est Europa, come Polonia e Ungheria, i livelli si aggiravano attorno al 3,8%, mentre in Danimarca il valore era pari allo 0%.

Enzima	Gruppo funzionale o sottogruppo	Numero di enzimi	Enzimi rappresentativi
CMY	1 – 1e	68	CMY-2; CMY-4
ACT	1 – 1e	9	ACT-1
ACC	1 – 1e	4	ACC-1
DHA	1 – 1e	8	DHA-2
MOX	1 – 1e	8	MOX-1
FOX	1 – 1e	9	FOX-2
TEM	2b – 2be – 2br – 2ber	172	
	2b	12	TEM-1; TEM-2; TEM-13
	2be	79	TEM-3; TEM-10; TEM-26
	2br	36	TEM-30; TEM-31, TEM-163
	2ber	9	TEM-50; TEM-158
SHV	2b – 2be – 2br	127	
	2b	30	SHV-1; SHV-11; SHV-89
	2be	37	SVH-2; SHV-3; SHV-115
	2br	5	SHV-10; SHV-72
CTX-M	2be	90	CTX-M-1; CTX-M-44; CTX-M-92
PER	2be	5	da PER-1 a PER-5
VEB	2be	7	da VEB-1 a VEB-7
GES	2f	15d	da GES-2 a GES-15
KPC	2f	9	da KPC-2 a KPC-10
OXA	2d – 2de – 2df	158	
	2d	5	OXA-1; OXA-2; OXA-10
	2de	9	OXA-11; OXA-14; OXA-15
	2df	48c	OXA-23; OXA-51; OXA-58
IMP	3a	26	da IPM-1 a IMP-26
VIM	3a	23	da VIM-1 a VIM-23
NDM	3a	3	NDM-1

Tabella 3: Principali famiglie di β -lattamasi importanti a livello clinico (EFSA, 2011)

Tra il 2007 e il 2008 in Italia è stata rilevata una prevalenza compresa tra lo 0,6-1,2% di isolati di *E. coli* di suino produttori di ESβL (Seiffert et al, 2013).

I geni codificanti per ESβL originano dai cromosomi di diverse specie di *Enterobacteriaceae* e la mobilizzazione di geni omologhi (*bla*) dal cromosoma originale è mediata dalla diffusione di specifici enzimi (integrasi). L'ulteriore diffusione di questi geni è determinato da spostamenti genetici orizzontali di plasmidi, determinando l'inserzione di sequenze quali trasposoni e integroni di Classe 1 (Leverstein-van Hall et al, 2011; Poirel et al, 2010; Carattoli A, 2009). Diverse famiglie di plasmidi sono emerse nelle *Enterobacteriaceae* e sono risultate in grado di trasportare geni codificanti per enzimi ESβL. La trasmissione di geni ESβL avviene attraverso i plasmidi *IncF*, *IncI*, *IncA/C*, *IncL/M* e *IncK* sia nell'uomo sia negli animali e in particolare i plasmidi delle famiglie *IncF* (51,1%), *IncI* (17,4%) e *IncN* (10,9%) sono stati rilevati in prevalenza nella flora commensale delle feci di animali sani, a prescindere dalla presenza di geni di resistenza, e nella flora fecale di uomini non oggetto di trattamento antibiotico (Antunes et al, 2010; Carattoli A, 2009). Molti di questi plasmidi (ie, *IncF*, *IncI*, *IncK*) possono replicare solamente nelle *Enterobacteriaceae* e mostrano un limitato spettro d'ospite, mentre altri plasmidi (ie, *IncA/C*) possono replicare all'interno di numerosi generi batterici e sono definiti plasmidi a ampio spettro d'ospite. In particolare i plasmidi di tipo *IncN*, *IncI* e *IncL/M* sono coinvolti nella diffusione dei geni *bla*CTX-M-1 e *bla*CTX-M-3 (Liebana et al, 2013). Ciò indica che queste famiglie di plasmidi sono naturalmente presenti in batteri commensali ed occasionalmente possono acquisire geni ESβL. I plasmidi *IncFII*, portatori di *bla*CTX-M-15, e *IncII1*, che trasporta il gene *bla*TEM-52, sono oggetto di particolare interesse per la loro diffusione in *E. coli* isolati sia nell'uomo sia negli animali (Carattoli A, 2009). Il plasmide *IncL/M* è stato identificato come il principale vettore del gene *bla*CTX-M-3 nell'Europa dell'Est e il plasmide *IncK* come portatore del gene *bla*CTX-M-14 diffuso prevalentemente in Spagna e UK (Cottell et al, 2011; Randall et al, 2011; Valverde et al, 2009; Hopkins et al, 2006). Lo studio della prevalenza dei plasmidi nelle popolazioni resistenti è fondamentale per tracciare la loro diffusione globale nella famiglia delle *Enterobacteriaceae* provenienti dall'uomo, dagli animali e dall'ambiente (Doi et al, 2017). Questi

plasmidi sono associati all'emergenza di varianti specifiche dei geni ES β L e la loro diffusione in batteri resistenti sembra essere strettamente connessa alla selezione ottenuta dall'utilizzo di antimicrobici.

I geni che codificano per β -lattamasi a spettro esteso sono stati identificati prevalentemente nelle *Enterobacteriaceae* e sono associati a elementi genetici mobili (MGEs, mobile genetic elements), quali inserzioni di sequenze (ISs), integroni, trasposoni, plasmidi ed elementi legati a fagi. È stato valutato che le inserzioni ISs e i trasposoni possono trasportare specifiche sequenze dal cromosoma ai plasmidi o tra plasmidi o da plasmidi a cromosoma, nel caso vengano coinvolti elementi coniugativi, quali plasmidi o trasposoni coniugativi, o fagi che si muovono tra diverse cellule batteriche. La varietà di questi veicoli di materiale genetico è una dei fattori favorenti la diffusione di β -lattamasi a spettro esteso (Doi et al, 2017). Fino agli anni 2000, SHV e TEM erano le varianti predominanti in *Escherichia coli* alla base di infezioni nosocomiali. Questi enzimi ES β L hanno sviluppato mutazioni ad ampio spettro, TEM-1 e SHV-1. Questi geni sono trasferiti attraverso plasmidi ad altri batteri, che si sono diffusi come cloni in ospedali e Paesi attraverso le movimentazioni dei pazienti (Damjanova et al, 2007; Baraniak et al, 2005).

Cap. 4- Geni di resistenza di tipo ES β L: *bla*CTX-M

Gli enzimi di tipo CTX-M sono stati identificati per la prima volta nel 1989 in Germania e sono stati definiti “cefotaximase-Munich”, per l’elevata efficienza nell’idrolizzare soprattutto il cefotaxime, rispetto al ceftazidime, al contrario di quanto accade per gli enzimi di tipo TEM e SHV (Tal et al, 2015).

La predominanza degli enzimi CTX-M sugli altri di tipo ES β L ha inizio nella prima decade del XXI secolo, a seguito dell’aumento della diffusione dei geni codificanti per la resistenza verso le cefalosporine ad ampio spettro (Mathers et al 2015). In particolare, agli inizi degli anni 2000, il gruppo di geni *bla*CTX-M ha iniziato ad emergere negli isolati umani (Hunter et al, 2010; Pitout JD and Laupland KB, 2008). Questi geni sono localizzati su plasmidi altamente trasmissibili e ciò determina una rapida ed efficiente diffusione della resistenza (Canton et al, 2008; Canton R and Coque TM, 2006). Inoltre, i batteri che esprimono gli enzimi CTX-M sono solitamente co-resistenti o multiresistenti, in particolar modo verso fluorochinoloni, aminoglicosidi e altri β -lattamici (Tal et al, 2015; Jacoby et al, 2006). Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi per determinare i fattori di rischio sulla diffusione di *bla*CTX-M. È stato valutato che uno dei principali fattori è rappresentato dall’utilizzo massivo di trattamenti antibiotici, anche indipendenti dal gruppo dei β -lattamici, sia a scopo profilattico sia a fini terapeutici (Dalhoff et al, 2017; EFSA, 2011). In *E. coli* isolati da infezioni ematiche nell’uomo è stata rilevata la presenza di una concomitante resistenza a cefotaxime, mediata da CTX-M, e a fluorochinoloni. Una caratteristica in comune tra questi ceppi resistenti è rappresentata dall’utilizzo di fluorochinoloni somministrati a scopo profilattico in concomitanza di procedure mediche a carico dell’apparato urinario (Tal et al, 2015). In numerosi studi, è stata valutata l’incidenza di resistenza verso le cefalosporine a spettro esteso in bambini e in

pazienti ospedalizzati, con evidenza di tassi superiori al 30%, sia in ceppi di *E. coli* sia di *K. pneumoniae* (Moremi et al, 2017; Liu et al, 2017; Mulki et al, 2017; Brodrick et al, 2017).

Un ulteriore fattore di rischio nella trasmissione di questo tipo di resistenza è stato identificato nell'utilizzo di presidi antibiotici in agricoltura e in veterinaria, in particolare nella catena degli alimenti di origine animale. Il possibile collegamento tra la diffusione di batteri produttori di CTX-M tra animali e uomo mediante gli alimenti è stato recentemente considerato a seguito della diffusione di ceppi resistenti produttori di enzimi di tipo CTX-M, soprattutto *E. coli* agenti di SEU, in soggetti giovani e sani (Tal et al, 2015). CTX-M è stato isolato anche negli animali selvatici, in particolare nei volatili, e negli animali da compagnia (Argudín MA, 2017; Wang et al, 2017). Questi riscontri sostengono l'ipotesi di un importante fenomeno di trasmissione delle resistenze attraverso le feci, soprattutto in soggetti sani, sia uomini sia animali (Mathers et al 2015). Un ultimo fattore di rischio che ultimamente è stato posto in evidenza sono gli spostamenti delle persone attraverso i continenti, soprattutto nei Paesi dell'est, quali India, e nel territorio africano (Reuland et al, 2016; Kantele et al, 2015).

Nell'ultima decade l'epidemiologia degli ESβL nell'uomo si è modificata con la diffusione mondiale di cloni batterici caratterizzati dalla presenza del gene *bla*CTX-M nella famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Tal et al, 2015; Livermore et al, 2007). Nel contempo si è anche modificata l'epidemiologia dei batteri in grado di produrre enzimi mediati da CTX-M: all'inizio degli anni 2000, sono cresciuti notevolmente i riscontri di *Escherichia coli* produttori dell'enzima CTX-M, soprattutto in UTIs, spesso complicate da stati di batteriemia, ma anche in infezioni a carico della cute (Woerther et al, 2013; Peirano et al, 2010; Paterson and Bonomo, 2005).

Al contrario degli altri enzimi ESβL, la famiglia CTX-M è complessa e costituita da un gruppo scarsamente omogeneo di enzimi. Gli enzimi appartenenti a questa famiglia sono differenziati in sei gruppi, ciascuno caratterizzato da una variabilità di almeno il 10% nelle sequenze amminoacidiche, definiti come CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC, ma recentemente sono stati identificati due ulteriori gruppi, CTX-M-74 e CTX-M-75 (Lahlaoui et al, 2014; D'Andrea

et al, 2013). Il gene (*bla*) che codifica per questi enzimi è molto simile a quello d'origine, proveniente dal cromosoma del genere batterico *Kluyvera*. Questo microrganismo fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* e si riscontra nel microbiota intestinale dell'uomo come microrganismo saprofito e opportunisto che raramente causa infezioni (Tal et al, 2015). La grande varietà del gruppo CTX-M è determinata da mutazioni puntiformi, favorite anche dalla pressione selettiva degli antibiotici (Lahlaoui et al, 2014). Ciascun gruppo di enzimi CTX-M è solitamente collegato ai geni *bla* cromosomiali presenti nelle diverse specie di *Kluyvera* (D'Andrea et al, 2013): ad esempio, il gene cromosomiale *blaKluc*, identificato in *K. cryocrescens*, è considerato il progenitore del gruppo CTX-M-1, mentre il gene *Klua* di *K. ascorbata* è considerato il punto di origine del gruppo CTX-M-2 (Tal et al, 2015). I gruppi CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 derivano rispettivamente da tre differenti geni cromosomiali di *K. georgiana*, mentre CTX-M-74 e CTX-M-75, sono considerati varianti del gruppo CTX-M-2 a seguito di modifiche di un singolo aminoacido (Lahlaoui et al, 2014).

In origine, i geni *bla*CTX-M sono stati acquisiti da elementi genetici mobili, definiti MGEs, come l'ISEcp1 e ISCR1, e sono stati trasferiti dal genoma di *Kluyvera* ai plasmidi di *Escherichia coli*. Alcune di queste MGEs, inoltre, incrementano l'espressione del gene CTX-M, determinando così laumento di forme di resistenza da un punto di vista clinico in *E. coli* (Lahlaoui et al, 2014). Gli elementi genetici mobili, che solitamente coinvolti nella trasmissione dei geni *bla*CTX-M, comprendono sequenze di inserzione (IS), integroni e trasposoni. Le IS, in particolare, partecipano alla sovra-espressione di questi geni e possono agire come unità complesse e alcuni plasmidi codificanti *bla*CTX-M possono trasportare al loro interno altri geni di resistenza, in particolare codificanti per AmpC- β -lattamasi, carbapenemasi e plasmidi che determinano resistenza ai chinoloni (PMQR) o agli aminoglicosidi (D'Andrea et al, 2013).

Ad oggi le ES β L di tipo CTX-M sono le più diffuse a livello globale e sono state riscontrate sia a livello di numerosi plasmidi sia a livello cromosomico. *Escherichia coli* risulta essere il più comune ospite del gene *bla*CTX-M, seguito da *Klebsiella pneumoniae*. La variante maggiormente diffusa nell'uomo è rappresentata da CTX-M-15, che deriva dal gruppo CTX-M-1, e dalla variante CTX-M-

14, che deriva dal gruppo CTX-M-9 (Liao et al, 2015). Negli animali appare predominante il gruppo CTX-M-1. La diffusione degli altri gruppi attualmente appare estremamente limitata, con il riscontro del gruppo CTX-M-2 in Sud America e in Giappone e del gruppo CTX-M-25 in Israele (EFSA, 2017; Dropa et al, 2015).

I plasmidi che trasportano *bla*CTX-M sono generalmente più piccoli rispetto quelli che trasportano TEM e SHV (Tal et al, 2015). Diversi elementi genetici, quali *ISEcpI* e *ISCR1*, sono coinvolti nella diffusione e nel passaggio del gene *bla*CTX-M. Elementi *ISEcpI*-like derivano dalla famiglia *IS1380* delle ISs e sono state identificate in associazione a geni derivanti da *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-25 e *bla*CTX-M-9, codificanti per ESβL (Smet et al, 2010; Cantón et al, 2006). Analisi più approfondite hanno dimostrato che elementi *ISEcpI*-like sono i principali responsabili della mobilizzazione di unità di trasposoni che includono il gene *bla*CTX-M (Lahlaoui et al, 2014). Un altro elemento IS specifico, trovato in associazione al gene *bla*CTX-M, è la regione *ISCR1*, formalmente identificata come *orf513* (Arduino et al, 2002). La funzione di questa regione resta tutt'ora poco chiaro, anche se numerose analisi la collegano al gruppo *IS91*-like, ovvero una famiglia di elementi mobili, che differiscono da gran parte degli elementi IS, sia a livello di struttura sia nelle modalità di trasmissione (Bae et al, 2007). La regione *ISCR1* è collegata alla trasmissione della variante CTX-M-14, la cui prevalenza è stata rilevata in diverse *Enterobacteriaceae*, in particolare *E. coli*, sia in pazienti umani sia in animali destinati alla produzione degli alimenti (Liao et al, 2015). CTX-M-14 appartiene al gruppo CTX-M-9, dal quale differisce per una sostituzione amminoacidica (Ala231Val) (Bae et al, 2007).

Cap. 5- Geni di resistenza di tipo ES β L: *blaSHV*

Il primo gene *blaSHV-1*, rilevato a livello del plasmide *p453*, è stato identificato nel 1979 in *E. coli* e l'enzima SHV-1 è in grado di determinare resistenza verso le penicilline e le cefalosporine di prima generazione (Liakopoulos et al, 2016).

La famiglia *blaSHV* (Sulphydryl Variable) deriva da mutazioni puntiformi di geni cromosomiali SHV-1 o SHV-2. Il progenitore del gene SHV-1 plasmide-mediato codificava per una penicillinasi specie-specifica a livello cromosomiale ed è stata identificata per la prima volta nel cromosoma di *K. pneumoniae*, isolato da neonati (Tal et al, 2015). Nel 1983 in un ceppo di *Klebsiella ozaenae* isolato in Germania è stato identificato il gene SHV-2, che presenta una mutazione singola (Gly238Ser), in grado di codificare per enzimi che sono in grado di idrolizzare tanto le penicilline quanto il cefotaxime e il ceftazidime, e sono inibiti dall'acido clavulanico (Liakopoulos et al, 2016).

Attualmente sono stati identificati oltre 193 varianti di SHV (<http://www.lahey.org/Studies/>), la maggior parte dei quali sono produttori di β -lattamasi a spettro esteso e attive verso cefalosporine di III generazione, ma anche verso monobattamici e carbapenemi (Liakopoulos et al, 2016; Smet et al, 2010). Tutte le varianti derivano dall'enzima SHV-1 e differiscono dal progenitore per la delezione (es: SHV-9 e SHV-10) o dall'inserzione (es: SHV-16) di materiale genetico (Liakopoulos et al, 2016); le mutazioni sono state rilevate in 79 posizioni.

Copie complete di inserzioni di sequenza (IS)₂₆ al confine di differenti regioni cromosomiali inducono la genesi di differenti trasposoni composti da IS₂₆ contenenti geni *blaSHV*. L'elevata capacità ricombinante delle strutture IS₂₆ contribuisce a definire una grande variabilità degli elementi genetici mobili codificanti per l'antibioticoresistenza (Beyrouthy et al, 2017).

Gli enzimi di tipo SHV possono essere divisi in tre sottogruppi in base alle caratteristiche molecolari o alle proprietà funzionali. Il sottogruppo 2b (7 varianti) è in grado di idrolizzare le penicilline e le

cefalosporine di prima generazione (es: cefalodrina e cefalotina) ed è fortemente inibito dall'acido clavulanico e dal tazobactam (Liakopoulos et al, 2016). Questo sottogruppo comprende numerose varianti dell'enzima SHV, in particolare SHV-2a, SHV-5 e SHV-12.

Il sottogruppo 2br (37 varianti) ha un ampio spettro di β -lattamasi e ha acquisito resistenza all'acido clavulanico. Infine, il sottogruppo 2be (46 varianti) comprende enzimi di tipo ES β L che possono idrolizzare un ampio range di oxiamino- β -lattamici (es: cefotaxime, ceftazidime, aztreonam) (Li et al, 2015). Oltre 99 varianti non sono ancora state classificate per mancanza di dati sulle caratteristiche biochimiche.

Il primo riscontro di resistenza di una cefalosporina di III generazione da parte di enzimi di tipo SHV risale al 1983, con l'isolamento del gene SHV-2, codificato dal plasmide *pBP60*, in isolati clinici di *K. ozaenae* in Germania e mostra solo pochi nucleotidi in comune con *blaSHV-1*.

In pochi anni sono state identificate altre varianti ES β L omologhe ai geni *blaSHV-1* e *blaSHV-2* (omologia del 50-90%). Le due varianti *blaSHV-3*, codificato dal plasmide *Pud18*, e *blaSHV-4* sono state isolate solo sporadicamente negli Stati Uniti ed è stato evidenziato in *E. coli* di origine animale (Liakopoulos et al, 2016). Nell'ultima decade sono comparse nuove varianti (*blaSHV-7*, *blaSHV-8*, *blaSHV-9*, *blaSHV-31*, *blaSHV-38*, *blaSHV-40*, *blaSHV-41* e *blaSHV-42*), la cui diffusione appare limitata ad un ristretto numero di casi.

I plasmidi coinvolti nella trasmissione del gene *blaSHV* sono rappresentati da:

- plasmide *IncF*, che fa parte del gruppo *IncF*, a ristretto spettro d'ospite. Questi plasmidi sono risultati coinvolti nella trasmissione di SHV-12 in *E. coli* isolati in Francia (*IncFII*), Tunisia (*IncFIA-FIB*, *IncFII-FIA*) e da animali di interesse zootecnico in Italia (*IncFIB*) (Liakopoulos et al, 2016, Bortolaia et al, 2010b);
- plasmide *IncHI2*, ad ampio spettro d'ospite, risulta essere il principale responsabile nella trasmissione di *blaSHV-12*. I plasmidi appartenenti a questo gruppo differiscono notevolmente in termini di dimensioni (95-400 Kb) e sono spesso associati a forme di co-resistenza (Liakopoulos et al, 2016);

- plasmide *IncI1*, a ridotto spettro d'ospite, favoriscono la disseminazione dei geni *blaSHV-2*, *blaSHV-2a* e *blaSHV-12*. Il *range* è estremamente limitato e comprende *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae* (Bortolaia et al, 2010b);
- plasmide *IncL/M* e *IncN* sono coinvolti nella diffusione dei geni *blaSHV-2*, *blaSHV-2a*, *blaSHV-5* e *blaSHV-12* in numerosi batteri, in particolare *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *S. enterica* sierotipo Typhimurium (Rodrigues et al, 2014);
- plasmide *IncX3* è un sottogruppo a stretto spettro d'ospite e gioca un ruolo fondamentale della diffusione di SHV-12. È stato identificato in *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*.

Molte varianti del gene *blaSHV* sono associate ad altre forme di resistenza: *blaSHV-45* è codificato a livello del plasmide *IncA/C* come *blaCTX-M-2* e *blaSHV-27*; *blaSHV-134* è codificato dal plasmide *IncFII* ed è associato a *blaVIM-1* e *blaSHV-105*, che conferisce una ridotta sensibilità a ceftazidime, al ceftriaxone e all'aztreonam, insieme a *blaSHV-1* e *blaSHV-5*. Quattro varianti sono state descritte esclusivamente in *E. coli*, in particolare *blaSHV-24*, identificato in Giappone e in grado di determinare resistenza al ceftazidime e non al cefotaxime e alla cefazolina (Liakopoulos et al, 2016).

Gli animali destinati alla produzione di alimenti sono diventati oggetto di studio in quanto reservoir di geni di resistenza: per quanto riguarda il *blaSHV*, le varianti maggiormente riscontrate negli animali sono rappresentate da *blaSHV-2*, *blaSHV-2a*, *blaSHV-5* e *blaSHV-12* e gran parte sono rilevati in *E. coli* isolati da campioni di feci di suini e broiler. In Tunisia sono stati identificati anche *E. coli* vettori del gene *blaSHV-15* da ritagli di carne (Blaak et al, 2014).

Cap. 6- Geni di resistenza di tipo ES β L: *bla*TEM

Ad oggi sono state identificate oltre 220 varianti del gene TEM- β -lattamasi e la maggior parte determinano un fenotipo di tipo ES β L (<http://www.lahey.org/Studies/>): tutte derivano dai geni *bla*TEM-1 e *bla*TEM-2, che hanno subito mutazioni puntiformi, e gran parte delle strutture genetiche mobile coinvolte nella loro trasmissione derivano dai trasposoni di classe II *Tn3* (Chaubey and Shenoy, 2017; Peymani et al, 2014).

La prima identificazione del gene *bla*TEM-1, codificante una penicillinasi, risale al 1965 in un *E. coli* isolato a livello ematico in un paziente ad Atene, ed è stato identificato con il nome Temoeira (TEM) (Tal et al, 2015; Bush and Jacoby, 2010). Successivamente lo stesso gene è stato rilevato in ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Oduro-Mensah et al, 2016). Diversi anni dopo è stato identificato l'enzima TEM-2 che differisce dal precedente per una singola mutazione amminoacidica (Gln39Lys) (Rubtsova et al, 2010). In contrasto con il resto delle ES β L mediate da TEM, i tipi TEM-1, TEM-2 e TEM-13 non codificano per β -lattamasi a spettro esteso e sono solamente in grado di idrolizzare le penicilline (Chen Z 2015; Rubtsova et al, 2010). Alcune tipologie di TEM sono risultate di avere un'affinità ridotta verso gli inibitori di β -lattamasi (Pimenta et al, 2014). In alcune varianti di TEM, definiti come CMT-1, CMT-2, CMT-3, CMT-4, è stata identificata la capacità di idrolizzare sia le cefalosporine di III generazione sia gli inibitori di β -lattamasi (Robin et al, 2011; Smet et al, 2010).

Il primo enzima di tipo TEM in grado di idrolizzare le cefalosporine è stato identificato successivamente e indicato come TEM-3, che è caratterizzato dalla mutazione Glu104Lys (Pimenta et al, 2014). Tutti i derivati di tipo TEM sono varianti di TEM-1, dal quale differiscono per singole sostituzioni amminoacidiche (da una a sette) e queste mutazioni sono state rilevate in 60 posizioni del genoma e le più frequenti si ritrovano in posizione 21, 39, 69, 104, 164, 182, 238, 240, 244, 265

e 275. La mutazione Gly238Ser, in particolare, determina la capacità di idrolizzare il cefotaxime e il ceftazidime con la stessa efficienza, mentre la mutazione Arg164Ser presenta una maggiore attività contro il ceftazidime (Rubtsova et al, 2010).

Tutti i geni *bla*TEM sono trasportati da trasposoni batterici definiti come Tn1, Tn2 e Tn3. Questi trasposoni, in particolare Tn3-like, contengono geni che codificano trasposasi (*tnpA*) e resolvasi (*tnpR*), cioè enzimi che determinano lo spostamento e l'inserzione di tratti di DNA. Questi enzimi sono identici tra loro per il 99% e le differenze si riscontrano a livello della regione a cavallo del sito di restrizione (Shaikh et al, 2015). In particolare il gene *bla*TEM-1 è trasmesso dal trasposone Tn3, che determina la trasmissione anche di CTX-M.15 a livello dello stesso plasmide (Carattoli A, 2009). Oltre ai trasposoni, sono coinvolti altri elementi genetici mobili nella diffusione del gene. La variante maggiormente rilevata tra le *Enterobacteriaceae* isolate negli animali, in particolare negli avicoli, nei suini e nei vitelli, e negli alimenti è rappresentata da TEM-52 (Arvand et al, 2015). La diffusione di questa variante è associata alla presenza di plasmidi, particolarmente epidemici, che fanno parte prevalentemente delle tipologie IncI1 e IncN, in particolare in *E. coli*. Questi plasmidi sono coinvolti anche nella trasmissione di altre ESβL epidemiche, quali SHV-12, CTX-M-1e CTX-M-32 (Carattoli A, 2013; Rodrigues et al, 2013).

Cap. 7- *Escherichia coli*: resistenza agli antibiotici e produzione di ESβL

Escherichia coli fa parte della flora presente comunemente nell'intestino di uomo e animali. Questa caratteristica, associata alla notevole resistenza nell'ambiente e alla capacità di diffusione, lo rende il principale patogeno isolato in numerose infezioni, in particolare a livello del tratto urinario, comprese le forme infettive a carico del rene, sia nella popolazione sia in ambito ospedaliero; inoltre gli *E. coli* sono spesso coinvolti nell'insorgenza di setticemie, peritoniti, infezioni a carico della cute, anche in associazione ad altri patogeni (Terlizzi et al, 2017; Wijetunge et al, 2015; WHO, 2014; Waters et al, 2011; Wiener et al, 1999). Le infezioni sostenute da *E. coli* generalmente originano dal paziente stesso che ne è portatore sano, attraverso la diffusione per continuità/contiguità o per via ematogena o per contatto. Ceppi dotati di particolare resistenza, però, possono originare anche da animali, attraverso gli alimenti di origine animale o il contatto diretto con questi (Ranjan et al, 2017). In particolare, questo microrganismo è considerato il principale indicatore di resistenza agli antibiotici tra i batteri Gram negativi (EFSA, 2017).

L'importanza degli *E. coli* commensali riguarda la presenza di geni di resistenza, posti su elementi genetici mobili (MGEs), che possono trasferirsi orizzontalmente ad altri batteri, anche patogeni, presenti nell'ambiente e anche lungo la filiera alimentare (Rasheed et al, 2014; Smet et al, 2010). Il monitoraggio della resistenza in questi batteri, isolati in animali sani, dalle carcasse e dagli alimenti di origine animale permette di definire la diffusione del problema, anche in riferimento all'utilizzo di trattamenti antibiotici in ambito zootecnico, che concorrono a determinare una pressione selettiva di ceppi resistenti (ECDC/EFSA/EMA 2017). Dal 2014 il monitoraggio delle resistenze in *E. coli* commensali negli animali e negli alimenti è diventato obbligatorio (EFSA/ECDC, 2017).

Le molecole più utilizzate in medicina umana e veterinaria per il trattamento delle infezioni sostenute da batteri Gram negativi, tra cui *Escherichia coli*, sono rappresentate da fluorochinoloni,

cefalosporine e antibiotici β -lattamici in associazione ad inibitori di β -lattamasi, sia in formulazione orale sia parenterale. Queste classi sono sempre state caratterizzate da sicurezza delle molecole, disponibilità e efficacia (Doi et al, 2017; WHO, 2017). La comparsa di resistenze ha determinato la compromissione dell'efficacia della terapia e la limitazione dei trattamenti disponibili verso i Gram negativi (Brodrick et al, 2017).

La resistenza in *E. coli* si sviluppa prevalentemente attraverso mutazioni, come nel caso della resistenza ai fluorochinoloni (es: ciprofloxacina, enrofloxacina), o attraverso l'acquisizione di elementi genetici mobili, come nel caso della resistenza verso le penicilline (es: ampicillina, amoxicillina) e le cefalosporine di terza e quarta generazione (es: ceftazidime, cefotaxime) (Zhou et al, 2015; Wener et al, 2010).

Nel 2015, 30 Stati hanno riportato i dati relativi alla presenza di *E. coli* resistenti ai fluorochinoloni (ciprofloxacina, levofloxacina e ofloxacina) con rilievo di un significativo aumento delle resistenze in sei Stati (Belgio, Croazia, Italia, Lituania, Slovenia e Svezia): in Italia la percentuale di cloni resistenti evidenziata nella popolazione è pari al 67,4% e si attesta al terzo posto dopo Romania (73%) e Cipro (68%). L'incidenza riguarda soprattutto i bambini sotto i 4 anni (13,8%), negli adulti (33,95%) e nelle persone di età superiore ai 65 anni (36%). La resistenza ai fluorochinoloni in *E. coli* dipende da diversi meccanismi: mutazioni nei geni che codificano per gli enzimi di resistenza (DNA girasi), presenza di MGE, in particolare plasmidi (topoisomerasi IV) e nella riduzione dell'accumulo del farmaco a livello della cellula batterica mediante l'alterazione delle pompe di flusso a livello della membrana (Huguet et al, 2013). I fluorochinoloni interagiscono con il DNA di *E. coli* mediante due enzimi, la DNA girasi e la topoisomerasi IV, che regolano le mutazioni a carico del cromosoma batterico durante la replicazione e la trascrizione, determinando inibizione degli enzimi e morte cellulare (Ruppé et al, 2015). La resistenza in questo caso si ha mediante la comparsa di mutazioni in alcune specifiche regioni del genoma (dette QRDRs) di subunità della DNA-girasi (*gyrA* e *gyrB*) e della topoisomerasi (*parC*). Negli ultimi anni sono stati identificati anche altri meccanismi di resistenza ai chinoloni mediati da plasmidi, come le proteine Qnr, che impediscono il legame tra le

topoisomerasi e l'antibiotico, e l'enzima AAC(6')-Ib-cr, tipico di *E. coli*, che inattiva alcuni fluoroquinoloni mediante acetilazione, e le pompe di flusso QepA e OqxAB, che riducono la concentrazione intracellulare di antibiotico (Jacoby et al, 2015; Frasson et al, 2011). Questi meccanismi di resistenza destano preoccupazione perché sono trasferibili e sono frequentemente associati con gli enzimi CTX-M e CMY (Ruppé et al, 2015). Inoltre, la resistenza ai fluorochinoloni è frequentemente associata a resistenza verso altre molecole antibiotiche (Hwang et al, 2014): in particolare l'Italia presenta un 14,6% di *E. coli* resistenti a fluorochinoloni, cefalosporine di III generazione e aminoglicosidi (ECDC, 2017).

Gli aminoglicosidi, che comprendono alcuni degli antibiotici più utilizzati in zootecnia come la streptomina, agiscono sulla cellula batterica bloccando la sintesi proteica, attraverso il legame con i ribosomi, con danneggiamento della membrana esterna dei batteri Gram-negativi (Song et al, 2014).

La resistenza agli aminoglicosidi in *E. coli* può essere dovuta all'alterazione (metilazione) dell'RNA ribosomiale 16S (rRNA), che impedisce alle molecole di antibiotico di legarsi ai ribosomi e mediante enzimi che alterano molecole bersaglio neutralizzando così l'effetto biologico degli aminoglicosidi. Inoltre, alcuni enzimi, come le metilasi ribosomali 16S, che conferiscono resistenza a tutti gli aminoglicosidi, possono accompagnare enzimi in grado di degradare i carbapenemi, come le carbapenemasi di tipo NDM (Fernández-Martínez et al, 2015; Zhang et al, 2014). In Europa, l'Italia presenta livelli di resistenza agli aminoglicosidi in *E. coli* attorno a percentuali del 20,2% dopo la Slovacchia (24,2%) (ECDC, 2017).

Le polimixine sono una famiglia di antibiotici che per anni sono state utilizzate, anche a scopo profilattico, in medicina veterinaria e tra questi la più utilizzata è stata la colistina, di cui dal 2016 su territorio italiano ne è stata vietata la commercializzazione (Decreto L.gs 117/2016). La resistenza alla polimixine in *E. coli* è considerata un grave problema negli allevamenti in particolare suini ed è mediata da mutazioni cromosomiche che determinano modifiche a carico degli LPS e conseguente incapacità di legame tra la membrana cellulare e l'antibiotico (Liu et al, 2016). Recentemente, sono

stati identificati in *E. coli* anche plasmidi che intervengono nella comparsa di resistenza alle polimixine (gene *mcr-1* e le varianti *mcr-1.2* e *mcr-2* (Xavier et al, 2016).

7.1- *E. coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso

La reale diffusione di ceppi batterici produttori di ES β L non è ancora del tutto conosciuta, in particolare per la prevalenza di ceppi ubiquitari e commensali, prevalentemente di *E. coli*, nell'ambiente e nelle feci dell'uomo e degli animali (Buelow et al, 2017; WHO, 2014). Dall'inizio del 2000 *Escherichia coli* è considerata la specie maggiormente coinvolta nella diffusione di geni di resistenza per cefalosporine di III e IV generazione e il fenomeno è la diretta conseguenza di un uso massivo di antibiotici appartenenti a queste categorie in medicina umana e veterinaria (Lahlaoui et al, 2014).

Stato	2012		2013		2014		2015	
	N°	%R	N°	%R	N°	%R	N°	%R
Europa	70.888	11,9	79.082	12,6	85.103	12,0	89.839	13,1
Italia	2.997	26,3	3.990	26,2	3.694	28,7	5.592	30,1

Tabella 4: *Escherichia coli* (2012-2015): situazione in Europa e in Italia. Numero totale di batteri isolati testati (N°) e percentuale degli isolati risultata resistente alle cefalosporine di III generazione (%R) (EARS-Net, 2017).

Nel triennio compreso tra il 2012 e il 2015 si è assistito ad un progressivo aumento degli isolati di *Escherichia coli* resistenti verso le cefalosporine di III generazione in Europa (Tabella 4) (EARS-net, 2017; Liebana et al, 2013). In Francia, Svizzera e Belgio la percentuale di *E. coli* resistenti è passata dal 5% a percentuali di resistenza comprese tra il 6 e il 10%, mentre Grecia, Portogallo e Spagna, che

presentavano percentuali inferiori al 10%, mostrano resistenze comprese tra 11 e 19% (EARS-net, 2017; Lahlaoui et al, 2014). I dati raccolti nell'ultimo rapporto dal sistema di sorveglianza in Europa (EARS-Net, 2017) evidenziano in Italia una situazione estremamente complessa con percentuali di incidenza del 30,1% (Fig. 6) di *Escherichia coli* resistenti alle cefalosporine di III generazione: dai dati rilevati dal sistema di sorveglianza, l'Italia, insieme alla Slovacchia (30%), è seconda dopo la Bulgaria (38,5%) ed è seguita dalla Romania (26,8%).

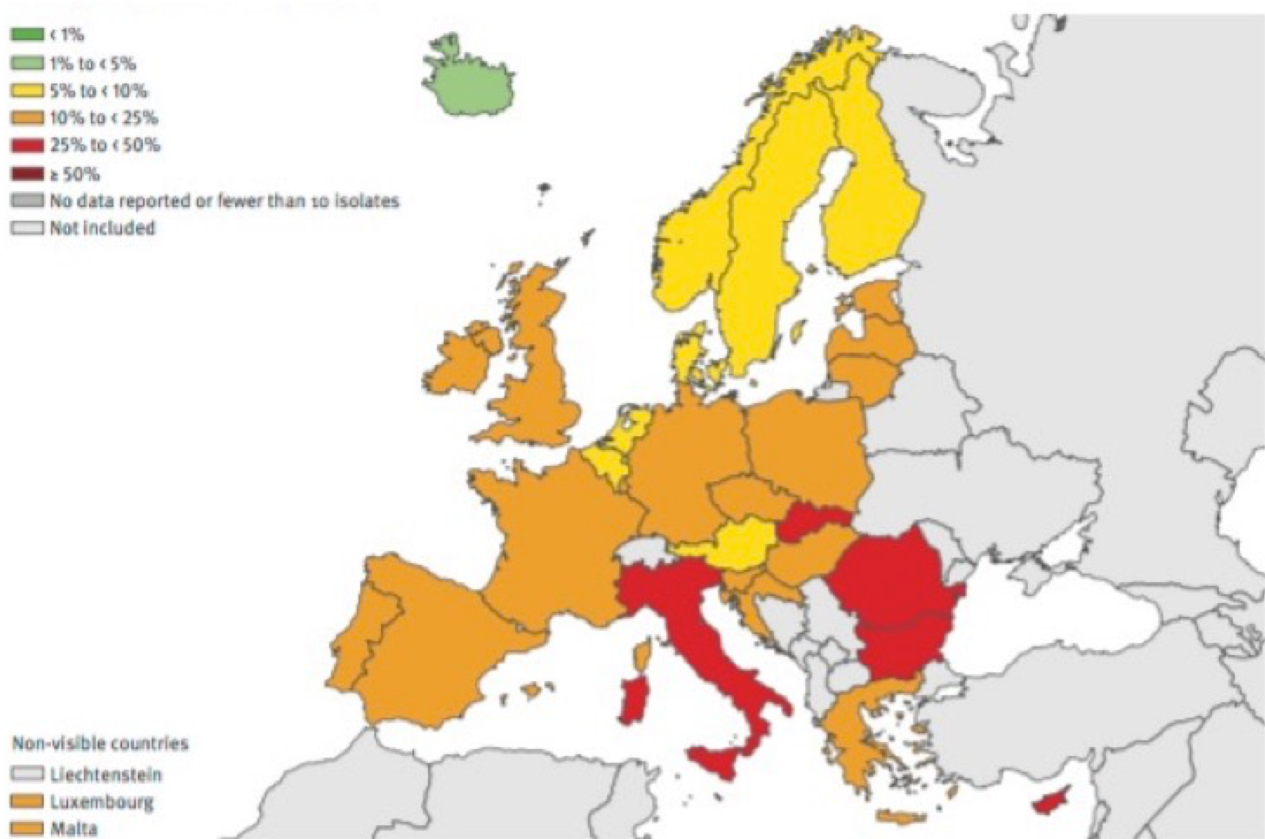


Fig. 7: Percentuali di *E. coli* con resistenza alle cefalosporine di III generazione nel 2015 (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

La diffusione di ceppi resistenti di *Escherichia coli* nelle feci umane risulta essere estremamente rilevante, fin dall'inizio degli anni 2000, e il progressivo aumento della diffusione annuale è stata stimato attorno al 5% (Doi et al, 2017; Woerther et al, 2013; Rodriguez-Bano et al, 2008). Vari studi hanno identificato la prevalenza in feci umane superiori al 50 % nei pazienti ospedalizzati (Brodrick et al, 2017; Buelow et al, 2017; Mulki et al, 2017). L'incidenza di *Escherichia coli* produttori di ESβL nel tratto urinario di pazienti ospedalizzati in USA è passato dal 7% circa del 2010 a percentuali superiori al 18% nel 2014 e al 27% dei ceppi (Lob et al, 2016). Questi isolati hanno presentato nella maggioranza dei casi produzione di enzimi di tipo CTX-M e la presenza concomitante di resistenze verso altri antibiotici, in particolare fluorochinoloni, con una sensibilità inferiore al 30% (Doi et al, 2017). Nel 2012, negli Stati Uniti, la presenza di ceppi di *E. coli* ESβL in donne ha riguardato prevalentemente ceppi provenienti dal tratto urinario con un'incidenza di resistenza al ceftriaxone pari al 4,5% in soggetti adulti di età inferiore ai 64 anni e un'incidenza pari al 9,5% in pazienti con più di 65 anni (Doi et al, 2017). In pazienti pediatriche si è evidenziato un aumento dell'incidenza dallo 0,26% nel 1999-2001 allo 0,92% del 2010-2011. In Spagna, nel 2015, l'incidenza di *Escherichia coli* produttori di ESβL nelle patologie del tratto urinario è stata pari al 24,9% (Medina-Polo et al, 2015). Ad oggi il CTX-M-15 è il tipo maggiormente isolato in *E. coli* sia nelle infezioni comuni sia nelle infezioni ospedaliere in numerosi Paesi tra cui Francia, Gran Bretagna, Canada, Spagna e Tunisia (EFSA, 2017).

La diffusione di ceppi multi-resistenti all'interno della popolazione è mediata da numerosi fattori che hanno determinato sia la comparsa di forme di resistenza sia la selezione dei ceppi resistenti, come l'abuso o l'uso non corretto dei trattamenti antimicrobici, sia una diffusione di cloni resistenti, come il contatto con l'ambiente, gli animali, gli spostamenti e le ospedalizzazioni (Doi et al, 2017; Wener et al, 2010; Rodriguez-Bano et al, 2008).

Escherichia coli produttori di ESβL sono stati isolati in animali di interesse zootecnico in numerosi Stati dell'Unione Europea, in particolare nel broiler, nel suino e nei vitelli. Questo ha spostato l'attenzione sul ruolo degli animali destinati alla produzione degli alimenti e degli alimenti di origine

animale stessi come possibile reservoir di batteri multi-resistenti (Carattoli A, 2008). Diversi studi sono stati condotti in Europa, analizzando la prevalenza in *Escherichia coli* in campioni di feci raccolti da animali di interesse zootecnico o da alimenti di origine animale. I primi dati (2000-2001) sulla prevalenza di ES β L hanno riguardato campioni di feci provenienti da animali sani raccolti al macello, all'interno del piano di sorveglianza nazionale in Spagna (Brinas et al, 2003b). Nello studio sono stati raccolti 120 campioni di feci con il rilievo di geni codificanti per β -lattamasi a spettro esteso (CTX-M-14 e SHV-12) nell'1,6% dei campioni analizzati. Uno studio analogo, con il controllo di 158 isolati, è stata condotto nel 2003 rilevando un aumento dell'incidenza e della varietà dei geni codificanti per ES β L (CTX-M-9, CTX-M-14, SHV-12) (Brinas et al, 2003a). Percentuali comprese tra il 10 e il 40% di *E. coli* sono stati isolati in broiler e in suini in Portogallo, Olanda, Francia e Repubblica Ceca. *Escherichia coli* produttori di ES β L sono stati identificati anche in due allevamenti antibiotic-free in Danimarca nel 2008 (EFSA, 2011). In Belgio sono stati isolati, nel 2008, *Escherichia coli* ES β L nel 45% dei campioni su 489, isolati da cinque diversi allevamenti di broiler (Smet et al, 2008).

In generale, la percentuale di *E. coli* portatori di ES β L provenienti da animali di interesse zootecnico e in alimenti di origine animale è estremamente variabile, con percentuali dallo 0.2% al 40.1% (ECDC/EFSA/EMA 2017). A livello europeo, il monitoraggio condotto, per i tre principali geni (TEM, SHV, CTX-M) nel 2011 dall'EFSA ha definito la circolazione di diversi sottotipi di ES β L in animali di interesse zootecnico, così distribuiti:

- **CTX-M:** CTX-M-1 (Spagna, Portogallo, Francia, Belgio, Danimarca, Italia, Olanda, UK, Germania, Repubblica Ceca), CTX-M-2 (Belgio, Danimarca, Olanda, UK, Irlanda), CTX-M-9 (Spagna, Francia, Danimarca, UK), CTX-M-14 (Spagna, Portogallo, Francia, Belgio, Danimarca and UK), CTX-M-15 (Francia, Belgio, UK, Germania, Danimarca), CTX-M-32 (Spagna, Portogallo, Italia, Grecia), e altre varianti di CTX-M (CTX-M-53 in Francia, CTX-M-3, -8, -17/18, -20 in UK);

- **SHV**: SHV-2 (Spagna, Portogallo, Olanda), SHV-5 (Spagna), e SHV-12 (Spagna, Francia, Italia, Olanda, Danimarca, Irlanda e Repubblica Ceca);
- **TEM**: TEM-52 (Spagna, Portogallo, Belgio, Olanda, Irlanda, Danimarca, Germania); TEM-20 (Olanda, Irlanda, Germania), TEM-106 (Belgio) e TEM-126 (Francia).

Dai risultati è possibile evidenziare che CTX-M-1 (63,5%) è la variante più presente in animali produttori di alimenti in Europa (Michael et al, 2017; Kilani et al, 2015; Valentin et al, 2014; Hunter et al, 2010). Allo stesso tempo i geni CTX-M-14 e CTX-M-32 risultano associati ad animali produttori di alimenti e ad alimenti nella regione del mediterraneo e negli Stati dell'Europa del sud (Tóth et al, 2013; Bortolaia et al, 2010b; Bortolaia et al, 2010a). Il gene CTX-M-15 è stato isolato in maniera diffusa nell'uomo ma solo sporadicamente in animali (pollame, vitelli) e alimenti derivati in Francia, Belgio e UK in *Escherichia coli* (ECDC/EFSA/EMA 2017).

L'emergenza e la diffusione di microrganismi produttori di ESβL nell'ambiente è un processo complesso ed è strettamente legato alla selezione di ceppi resistenti, ubiquitari e commensali, che agiscono come vettori di elementi genetici mobili (plasmidi) codificanti i geni per ESβL (Doi et al, 2017; Carattoli A, 2008). Il ruolo della pressione selettiva determinata dall'utilizzo degli antibiotici è importante, sia in medicina veterinaria sia in medicina umana, nella diffusione della resistenza in batteri commensali rilevabili nell'intestino di animali produttori di alimenti (Smet et al, 2010; Jorgensen et al, 2007). Un ulteriore fattore che influisce sulla comparsa di resistenza è la pressione selettiva esercitata dai residui di antibiotici, a seguito dell'utilizzo delle molecole nell'allevamento, rilevabili nell'ambiente in particolare nelle aree attigue agli allevamenti (Dohmen et al, 2017; Furtula et al, 2010).

Gli *E. coli* possono infettare gli animali e l'uomo, colonizzando il tratto intestinale. La prima conseguenza della colonizzazione del tratto intestinale degli animali è la disseminazione di batteri resistenti lungo la catena alimentare e nell'ambiente, che può agire come reservoir (Projahn et al, 2016). I batteri resistenti si diffondono nell'ambiente, nel suolo, negli allevamenti, nei sistemi idrici e negli alimenti (di origine animale e vegetale), per contaminazione fecale e possono determinare il

passaggio diretto di batteri da animali a uomo (Evers et al, 2017; Randall et al, 2017; Goncalves et al, 2010). La durata della persistenza e della disseminazione mediante le feci non è ancora del tutto conosciuta ed è estremamente variabile. È stato dimostrato che in bovine la disseminazione di *Salmonella* spp. produttrici di ESβL nell'ambiente persiste per 68 giorni dopo l'infezione (Lanzas et al, 2009).

La trasmissione di ceppi resistenti, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, a seguito dall'assunzione di cibo contaminato è stata oggetto di numerosi studi. Report ufficiali mostrano la una possibile diretta associazione tra cibo e la diffusione di ceppi di *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* multi-resistenti nell'uomo e negli animali: la trasmissione è legata prevalentemente all'assunzione di latte crudo, di carne cruda di manzo e maiale, a problemi riscontrati durante trattamenti termici (ad esempio la pastorizzazione) (Chen et al,2017; Evers et al, 2017; Randall et al, 2017). In uno studio, il 35% degli isolati clinici di *E. coli* dall'uomo ha mostrato la presenza di geni, codificanti ESβL, analoghi a quelli identificati in *E. coli* isolati dal pollame (Leverstein-van Hall et al, 2011). Prove a sostegno della potenziale trasmissione e della successiva colonizzazione da parte di *Escherichia coli* tra animali e personale impiegato negli allevamenti sono state riportate da diversi studi condotti negli ultimi anni nel personale impiegato lungo la filiera zootecnica (prevalentemente in allevamento) (Dohmen et al, 2017). In uno studio recente, sono stati identificati ceppi di *E. coli* dagli allevatori, sia a livello della mucosa nasale sia delle feci, con profili genetici e di antibioticoresistenza (CTX-M-1) analoghi a quelli isolati negli animali della stessa azienda (Fischer et al, 2017).

Cap. 8- Controllo della resistenza agli antibiotici nella filiera suina: le linee guida

La definizione dei fattori di rischio nella diffusione di batteri multi-resistenti è complicata a causa dei pochi dati a disposizione e per la capacità dei batteri produttori di ESBL di entrare e diffondersi in allevamento attraverso l'ingresso di nuovi animali, l'esposizione all'aria contaminata, l'acqua e l'alimento (ECDC/EFSA/EMA, 2017). Anche gli infestanti ambientali, come i roditori, o animali selvatici possono agire come reservoir (Wang et al, 2017; Wener et al, 2010). All'ambiente si aggiunge il contatto uomo-animali e tra gli animali stessi e l'allevamento ha quindi un ruolo fondamentale nell'amplificare la resistenza (Dohmen et al, 2015; Visschers et al, 2015).

In contrasto a quanto indicato nei principi di biosicurezza di igiene e sanificazione, la pulizia accurata degli ambienti può tradursi in un fattore di rischio importante perché concorre nella selezione di batteri resistenti ai disinfettanti e a trattamenti chimici: è stato anche dimostrato che misure di sanificazione particolari possono determinare un aumento dell'incidenza di batteri resistenti alle tetracicline, soprattutto di coliformi lattosio positivi (Dewulf et al, 2007).

I batteri produttori di β -lattamasi ad spettro esteso (ESBL) stanno emergendo in tutto il mondo sia negli esseri umani che negli animali e in particolare l'uso di cefalosporine di terza e quarta generazione nell'allevamento di animali destinati alla produzione di alimenti ha portato alla diffusione di *Escherichia coli* resistenti (Hammerum et al, 2014).

La resistenza negli isolati di *E. coli* dai suini si è modificato nel corso degli anni: la resistenza all'ampicillina (39,3%), al sulfametossazolo (44,2%), alle tetracicline (54,7%) e al trimethoprim (35,3%) nel 2015 è risultata molto elevata nella maggior parte dei Paesi europei, con l'eccezione di alcuni Paesi nordeuropei (Finlandia, Norvegia e Svezia) che hanno registrato minori livelli di resistenza agli antimicrobici sopra menzionati. La resistenza al cloramfenicolo nel suino varia ampiamente, mentre la resistenza alla gentamicina è generalmente riportata a livelli molto bassi o

bassi, ad eccezione di Cipro, che registra un'elevata resistenza (EFSA, 2017). La resistenza alla ciprofloxacina e all'acido nalidixico varia notevolmente tra i Paesi con percentuali di resistenza pari rispettivamente al 10,5% e al 6,0%, fatta eccezione per Finlandia, Svezia e Norvegia che hanno riportato una resistenza molto bassa (EFSA, 2017).

La resistenza a cefotaxime e ceftazidime nei suini non è stata rilevata in 11 Stati membri o è stata riportata a bassi livelli nei Paesi coinvolti nel monitoraggio, con percentuali pari rispettivamente all'1,4% e all'1,3%. La resistenza al cefotaxime e al ceftazidime è stata simile o la resistenza al cefotaxime ha leggermente superato la resistenza al ceftazidime nella maggior parte dei Paesi, eccetto che per la Polonia dove la resistenza al ceftazidime nei suini ha superato quella verso il cefotaxime (ECDC, 2017). La resistenza all'azitromicina è generalmente molto bassa o bassa (resistenza totale pari al 2,8%), ad eccezione del Portogallo che ha riportato una moderata resistenza (14,6%) e Cipro che ha mostrato un'elevata resistenza (45,5%) all'azitromicina (EFSA, 2017).

Molecola Antibiotica	Percentuali in Italia
Ampicillina	63,7 %
Azitromicina	1,8 %
Cefotaxime	0,6 %
Ceftazidime	0 %
Cloramfenicolo	32,7 %
Ciprofloxacina	14,9 %
Colistina	0,6 %
Gentamicina	42 %
AmpC	10,7 %
ESβL	40 %
Cefotaxime + Ceftazidime	0 %
Trimethoprim	58,3 %
Tigeciclina	0 %
Tetraciclina	72 %
Sulfametossazolo	63,1 %
Ac. nalidixico	6,5 %
Meropenem	0 %

Tabella 5: Percentuali rilevate in *E. coli* isolati in suini in Italia nel 2015 (EFSA, 2017)

La resistenza a colistina è risultata complessivamente molto bassa (0,4%) e non è stata registrata in 18 dei 29 paesi dichiaranti; nessuno dei paesi dichiaranti ha riportato resistenza a meropenem (EFSA, 2017). La resistenza alla tige ciclina è stata segnalata solo da due Stati membri (Cipro 14,5% e Malta 1,5%). Le percentuali riportate in Italia nel 2015 dall'EFSA (2017) sono riportate nella Tabella 5.

Numerosi studi condotti nel corso degli anni hanno confermato la presenza di alti livelli di resistenza in *E. coli* isolati dalle feci dei suini allevati in modo intensivo: queste resistenze sono state correlate in prevalenza alla presenza di integroni di Classe I (Lee et al, 2014).

I β -lattamici sono tra i più importanti gruppi di antimicrobici utilizzati in medicina umana e veterinaria: penicilline, aminopenicilline (associate o meno ad acido clavulanico) e cefalosporine (I-IV generazione) sono sottogruppi appartenenti alla categoria dei β -lattamici. Sono state approvate numerose molecole in medicina veterinaria e vengono tutt'ora utilizzate anche nell'allevamento, sia in formulazione orale sia iniettabile (Visschers et al, 2016; Coyne et al, 2014; Persoons et al, 2010). Tra le cefalosporine di III generazione autorizzate nei suini, una delle più utilizzate è il ceftiofur, somministrabile nel caso di varie patologie (respiratorie, setticemia, poliartriti, polisierositi). In uno studio condotto su suini trattati con una formulazione long-acting di ceftiofur è stata identificata la presenza in *E. coli* isolati dalle feci in possesso di plasmidi veicolanti il gene *bla*CTX-M-1 (Fleury et al, 2015).

Va ricordato che in medicina veterinaria è ammesso l'utilizzo off-label di farmaci, tra cui antibiotici in animali destinati alla produzione di alimenti solo per evitare sofferenze agli animali (art. 11 della Direttiva 2004/28/CE) dovrebbe restare una pratica estremamente restrittiva e riguardare solo casi eccezionali con la prescrizione di:

- farmaci registrati per specie diversa o per la stessa specie ma altra patologia;
- in caso di mancanza di farmaci secondo punto 1, possono essere prescritti medicinali autorizzati per l'uso umano o un medicinale registrato in altro Stato europeo;
- in mancanza di prodotti disponibili, secondo primi due punti, da medicinali preparati in modo estemporaneo dal farmacista.

Nonostante le indicazioni e le restrizioni, anche l'uso illegale di molecole è stato spesso riscontrato in passato. Quindi il possibile uso di antimicrobici in modo estensivo, illecito o improprio, rappresenta tutt'oggi il fattore di maggior rischio nella selezione e successiva diffusione di cloni resistenti (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

L'uso di antibiotici appartenenti a classi diverse può determinare la selezione di cloni resistenti produttori di β -lattamasi, indipendentemente dall'uso di cefalosporine in allevamento, soprattutto in batteri commensali, quali *Escherichia coli*. L'utilizzo di cefalosporine di III o IV generazione determina l'emergenza di batteri produttori di ES β L, attraverso la selezione diretta di varianti resistenti o determinando una selezione vantaggiosa di batteri codificanti questi enzimi, andando a ridurre microflora competitiva, sensibile ai trattamenti antibiotici (Cameron-Veas et al, 2015). Diversi studi hanno dimostrato che la costante pressione selettiva ottenuta attraverso l'uso di vari β -lattamici, incluse le penicilline e cefalosporine di prima generazione, può aver contribuito alla selezione *in vivo* di batteri ES β L (Doi et al, 2017). L'uso di cefalosporine e di aminoglicosidi è considerato un fattore di rischio per la selezione di ES β L fin dagli anni novanta, con l'identificazione di enzimi appartenenti al gruppo TEM e SHV (Jorgensen et al, 2007). Negli ultimi anni si è osservato a un aumento dell'incidenza di enzimi CTX-M in associazione all'utilizzo smodato di fluorochinoloni, identificati tra i nuovi fattori di rischio (Zahar et al, 2009; Canton et al, 2008).

Sono state valutate diverse misure di controllo per arginare il problema della resistenza antibiotica (Liebana et al, 2013):

- la riduzione o il divieto di utilizzo di cefalosporine di III e IV generazione, in animali destinati alla produzione di alimenti;
- rispetto della normativa vigente sull'uso del farmaco, in particolare limitando l'uso off-label;
- riduzione dell'utilizzo degli antibiotici lungo la filiera zootecnica implementando il monitoraggio anche a livello della prescrizione del farmaco;
- implementare le campagne informative;

- implementare le misure di controllo della diffusione promuovendo l'applicazione di sistemi di biosicurezza e introducendo un sistema di controllo negli alimenti di batteri produttori di ESβL e AmpC;
- implementare le misure di igiene lungo la filiera alimentare.

L'uso adeguato di antimicrobici in medicina umana e veterinaria è uno dei principali settori strategici dell'UE nel quadro del contrasto alla resistenza antimicrobica e nel 2015 sono state pubblicate le linee guida sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria (Commissione Europea, 2015).

Le linee guida del 2015 hanno introdotto l'importanza della scelta di un trattamento antibiotico per salvaguardare il benessere e la salute degli animali e la prescrizione dovrebbe essere confermata da una diagnosi veterinaria. Inoltre, è stata spostata l'attenzione sull'utilizzo di antibiotici di importanza critica, il cui utilizzo dovrebbe essere giustificato da diagnosi di laboratorio (MIC, antibiogramma) e l'uso off-label dovrebbe essere limitato ai casi ove non sono permesse alternative per ridurre lo stato di sofferenza degli animali (Commissione Europea, 2015). Per quanto riguarda l'allevamento del suino, le linee guida proponevano di implementare la biosicurezza, il management e l'igiene degli allevamenti, in particolare attuando sistemi di produzione "tutto pieno, tutto vuoto", la pulizia approfondita e il miglioramento delle strutture e dei piani di vaccinazione. Le linee guida prevedevano anche la limitazione degli scambi e degli spostamenti di suini per ridurre la diffusione di infezioni e di microrganismi resistenti (Commissione Europea, 2015).

Il 30 giugno del 2017 la Commissione Europea ha adottato lo "*European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance*" con il fine di migliorare piani di controllo della diffusione della resistenza antibiotica, anche attraverso lo sviluppo della ricerca, disegnando un quadro d'azione globale, che coinvolga attivamente sia il settore veterinario sia umano (One Health). In Italia, anche a seguito della Decisione 2013/652/UE, il Ministero della Salute ha istituito una banca dati nazionale che raccoglie i dati provenienti dai monitoraggi regionali o dagli studi di prevalenza sulle infezioni rilevate presso gli ospedali, mentre per il settore veterinario ha introdotto indagini conoscitive sulla

situazione delle filiere zootecniche, promuovendo strategie di valutazione e di prevenzione del problema. Dal 2014 è attivo per il settore veterinario il Piano di monitoraggio della resistenza agli antimicrobici nei batteri zoonotici e commensali.

In Italia, il 27 luglio 2017 è stato approvato il “Piano Nazionale di Contrasto all’Antibioticoresistenza 2017-2020” (PNCAR) che ha come scopi principali la riduzione della frequenza delle infezioni da microrganismi resistenti agli antibiotici e la riduzione della frequenza delle infezioni associate all’assistenza sanitaria ospedaliera e comunitaria. Per il raggiungimento di questi obiettivi sono stati selezionati degli indicatori sintetici nel settore della sorveglianza del consumo degli antibiotici, delle infezioni e dei microrganismi resistenti. In particolare, il Piano prevede la riduzione di almeno il 10% di fluorochinoloni sia in ambito ospedaliero sia in ambito territoriale entro il 2020 e in generale prevede una riduzione di almeno il 10% di antibiotici sistemici utilizzati sia in ambito ospedaliero sia territoriale.

Per quanto riguarda il settore veterinario, il PNCAR prevede la riduzione di almeno il 30% del consumo di antibiotici in formulazione orale e una riduzione di almeno il 10% di CIA nel settore veterinario. Inoltre, il Piano prevede in ogni Regione l’istituzione di un piano di monitoraggio dell’antibioticoresistenza. In Italia, la filiera suina rappresenta uno dei punti critici nell’ambito del problema delle resistenze agli antibiotici e gli aspetti più critici sono rappresentati da: un uso frequente di antibiotici di importanza critica, soprattutto cefalosporine, un ridotto utilizzo di esami di laboratorio, un uso dei trattamenti di massa, la somministrazione di mangime medicato o di antibiotici mediante l’abbeverata e l’uso di antibiotici a scopo profilattico/metafilattico.

Le conoscenze attuali definiscono la necessità di prevenire la circolazione di patogeni attraverso l’applicazione di norme di biosicurezza e una miglior gestione degli allevamenti e delle fasi più critiche (es: svezzamento). Inoltre, risulta indispensabile eliminare i trattamenti di massa, prediligendo i trattamenti individuali anche a seguito di una specifica diagnosi.

Antimicrobico	DIAGNOSI	Trattamento INDIVIDUALE	Trattamento Metafilattico	MASSA Profilattico
I° SCELTA	Clinica: sintomatologica	da preferire	possibile	evitato e/o limitato a casi eccezionali
II° SCELTA	Diagnosi eziologica + test di sensibilità; resistenza e/o inefficacia antimicrobici I° Selta	da preferire	possibile	evitato e/o limitato a casi eccezionali
III° SCELTA	Diagnosi eziologica + test di sensibilità; resistenza e/o inefficacia antimicrobici I° e II° Selta	da preferire	solo in casi eccezionali	Non accettabile

Fig. 8: Categorizzazione delle molecole antibiotiche secondo le linee guida sull'uso degli antibiotici nell'allevamento suino (Diegoli et al, 2017).

Le linee guida sull'uso degli antimicrobici nell'allevamento suino proposte dalla regione Emilia Romagna e dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, che sono state presentate a settembre del 2017, propongono la diagnosi dell'agente eziologico e l'applicazione dei test di sensibilità agli antimicrobici come i requisiti fondamentali per un uso razionale del farmaco. Per quanto riguarda la scelta degli antibiotici, le molecole sono state categorizzate in di prima, di seconda e di ultima scelta (Fig. 8). Gli antimicrobici di prima scelta possono essere utilizzati sulla base della diagnosi clinica del veterinario, ma la prescrizione dovrebbe essere confermata dalla diagnosi eziologica e andrebbe preferita la somministrazione individuale. L'antibiotico di seconda scelta andrebbe utilizzato dopo un test di sensibilità *in vitro* che dimostri l'inefficacia del trattamento di prima scelta. Gli antimicrobici di ultima scelta dovrebbero essere somministrati dopo una diagnosi eziologica e la dimostrazione dell'inefficacia di trattamenti di prima e seconda scelta.

Cap. 9: Il biofilm in *Escherichia coli*: caratteristiche e implicazioni sanitarie

Escherichia coli è un batterio coliforme che si comporta prevalentemente come commensale dell'intestino dell'uomo e degli animali, ma che si può riscontrare anche su altri tessuti e nell'ambiente, tra cui suolo, alimenti, acque e numerose superfici (impianti medici e cateteri) attraverso la formazione di strutture complesse indicate come biofilm (Ranjith et al, 2017).

In natura, infatti, la principale modalità di crescita e di sopravvivenza delle cellule batteriche è rappresentata dalla creazione di comunità cellulari che aderiscono alle superfici, determinando la comparsa di resistenza a numerose condizioni ambientali e la persistenza nell'ambiente stesso (Marti et al, 2017). La caratteristica principale di queste comunità complesse è quella di proteggere i batteri da eventuali fattori di stress presenti nell'ambiente, come le radiazioni UV, lo shock osmotico, i trattamenti termici, gli antibiotici e il sistema immunitario (Branda et al, 2005; Davey and O'Toole, 2000).

La contaminazione ambientale nell'industria alimentare da parte di *E. coli* può avvenire in diversi modi, a cominciare dalla contaminazione fecale sia dell'ambiente sia delle carcasse in fase di macellazione. Inoltre, i batteri presenti nelle feci e quindi nel letame possono contaminare le coltivazioni, con tendenza a persistere sui vegetali. La diffusione di *E. coli* nell'ambiente e sulle superfici può anche essere legato all'utilizzo di acqua contaminata (Nesse et al, 2014).

In generale, la sopravvivenza nell'ambiente di *E. coli* è mediata dall'abilità di formare biofilm. Gli *E. coli* sono in grado di sviluppare biofilm su differenti materiali, soprattutto a livello degli impianti di macellazione, come superfici di acciaio inossidabile, polistirene, vetro, poliuretano e polietilene ad alta densità (Coughlan et al, 2016).

L'introduzione nell'industria alimentare di carne contaminata da *E. coli* organizzato in biofilm ne determina la diffusione nell'ambiente, all'uomo e agli animali. Nonostante i trattamenti di

disinfezione normalmente applicati nell'industria alimentare, è stata dimostrata la persistenza di questi batteri sia nei macelli sia negli impianti industriali e l'impossibilità di prevenire completamente la contaminazione (Dourou et al, 2011).

L'importanza nella diffusione di *E. coli* attraverso formazione di biofilm, è dovuta sia alla possibile trasmissione di ceppi patogeni attraverso l'ambiente e le fonti alimentari, ma anche all'aumentata possibilità di trasmissione tra le cellule batteriche di elementi genetici mobili e quindi di diffusione di forme di virulenza o di resistenza anche agli antibiotici (Maheshwari et al, 2016; Gomes et al, 2015; Van Meervenne et al, 2014).

I batteri che formano biofilm sono immersi in una matrice extracellulare che contribuisce a definire la struttura generale, promuovendo l'adesione alla superficie e intercellulare, la sua conservazione e la comparsa di resistenza ad antibiotici e trattamenti di sanificazione (Serra and Hengge, 2014). La matrice è costituita principalmente da sostanze polimeriche come proteine, fibre amiloidi, acidi nucleici (DNA), polisaccaridi, lipidi e acqua (Marti et al, 2017; Flemming and Wingender, 2010). L'esatta composizione, però, dipende dai batteri che formano il biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* è in grado di produrre grandi quantitativi di due eso-polisaccaridi aggregativi, Pel e Psl, mentre *Escherichia coli* combina soprattutto fibre amiloidi e cellulosa. Il DNA extracellulare che compone le matrici deriva dalla lisi cellulare, mediata da profagi e da varie autolisine, e contribuisce alla viscoelasticità dei biofilm e ne favorisce l'espansione (Das et al, 2013; Gloag et al, 2013).

I biofilm possono essere classificati in base all'attività dei batteri che lo formano e diverse sottopopolazioni di batteri sono localizzate all'interno del biofilm in base all'attività metabolica: le cellule sulla superficie sono generalmente aerobie, mentre quelle localizzate in profondità sono prevalentemente a metabolismo fermentativo o sono inattive (Dakheel et al, 2016). Perciò, nei biofilm si trovano strati distinti di matrice e sottopopolazioni di batteri, con conseguente pressioni selettive differenti. In molti casi sono stati identificate infezioni associate a biofilm, la cui eliminazione risulta generalmente complessa a causa dell'elevata resistenza a molti trattamenti antibiotici (Steenackers et al, 2016).

L'attività metabolica delle cellule costituenti il biofilm varia notevolmente con uno strato profondo di cellule inattive la cui scarsa attività metabolica le rende estremamente complesse da eradicare (Conlon et al, 2015). Per questo motivo i biofilm sono il principale problema non solo in ambito ospedaliero, dove possono essere la causa di infezioni, ma possono colonizzare l'ambiente circostante, come la strumentazione medica, o diffondersi nell'industria alimentare (Marti et al, 2017). La formazione di biofilm su materiali diversi come gomma, polietilene, acciaio inossidabile, vetro e altre superfici a contatto con gli alimenti può complicare notevolmente le procedure di sanificazione con il rischio di diffusione di agenti di malattia o portatori di forme di resistenza (Dakheel et al, 2016). Inoltre, *Escherichia coli* è in grado di interagire con altri microrganismi, sviluppando biofilm caratterizzati da diverse specie batteriche, sia Gram negativi sia positivi. Ceppi isolati dall'acqua o dalle superfici nell'industria degli alimenti hanno dimostrato come sia facile rilevare la presenza di co-adesione e della formazione di biofilm misto mediato da *E. coli*, mediante un contatto diretto tra le cellule (Giaouris et al, 2015).

Un problema è rappresentato, per esempio, dall'impossibilità di utilizzare molti trattamenti termici, in particolare la sterilizzazione, nell'industria alimentare, per l'esigenza di mantenere le caratteristiche organolettiche dei prodotti alimentari: l'applicazione di temperature inadeguate o il consumo di alimenti crudi o parzialmente cotti rientrano normalmente nei principali fattori di rischio di trasmissione di agenti patogeni, che possono persistere anche grazie alla formazione di biofilm (Marti et al, 2017).

Anche in ambito clinico e ospedaliero è stata posta l'attenzione verso quelle strumentazioni che difficilmente possono essere sottoposte a trattamenti di sanificazione profonda, come gli endoscopi, che possono diventare un veicolo di batteri ma soprattutto possono diventare un terreno fertile per la crescita di biofilm (Dakheel et al, 2016; Conlon et al, 2015): temperature inferiori a 60° C sono generalmente del tutto inefficaci nell'eliminazione di numerose forme patogene e dell'eventuale biofilm presente sulle superfici, soprattutto per quanto riguarda numerose *Enterobacteriaceae*, come *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp. ed *Escherichia coli*.

La resistenza al calore è dovuta alla presenza di elementi genetici legati a plasmidi, come gli operoni Clp ATPase e ClpK, che codificano per resistenze termiche (Marti et al, 2017). Numerosi ceppi di *E. coli* resistenti ai trattamenti termici sono stati rilevati all'interno di diversi alimenti, in particolare nel latte crudo (Marti et al, 2017). In uno studio del 2010 sono stati analizzati oltre 250 ceppi di *E. coli* isolati dal latte crudo e sono stati testati per la presenza di due geni di resistenza verso i trattamenti termici (*clpK* e *orfI*): il 95,7% degli isolati sono risultati positivi ad entrambi i geni (Marti et al, 2017). La correlazione tra la formazione di un biofilm resistente e la resistenza al calore possono favorire la persistenza dei batteri nell'ambiente, ma anche il passaggio di batteri attraverso gli alimenti. La formazione di biofilm può costituire un'ulteriore protezione per batteri, tra cui *E. coli*, da eventuali shock termici (Marti et al, 2016). Infezioni persistenti del tessuto mammario nella bovina sono generalmente correlati alla formazione di biofilm: studi precedenti hanno dimostrato la possibilità di trasferire i plasmidi ESβL da *E. coli* resistenti al calore ad altri *E. coli*, inclusi ceppi patogeni. Ciò è associato all'aumentata possibilità all'interno del biofilm di trasferimento orizzontale di geni (Marti et al, 2016).

Escherichia coli può essere identificato su numerosi tessuti, in particolare a carico della mucosa del tratto urinario, a livello intestinale e sulla superficie dell'occhio (Ranjith et al, 2017): ad esempio, *E. coli* enteroaggregativi (EAEC) sono caratterizzati dall'adesione alle cellule mucosali con la formazione di una struttura simile a tanti mattoni sovrapposti. Questo aspetto, indicato con il nome di "aderenza aggregativa" (AA, aggregative adherence) è mediato da fimbrie specifiche (AAF) codificate da plasmidi (AAp) (Pereira et al, 2010).

La formazione di biofilm è complessa e segue specifiche fasi (Vogeleer et al, 2014):

- Contatto iniziale: è la prima fase nella formazione del biofilm ed è rappresentato da un contatto reversibile ad una superficie da parte delle cellule batteriche. Questa fase dipende dal bilanciamento di forze attrattive e repulsive tra batteri e superficie. L'adesione è influenzata dalle condizioni ambientali tra cui la temperatura, il pH, le forze ioniche del *medium* e la rugosità della superficie di contatto. Alle caratteristiche ambientali si aggiungono fattori

batterici come l'idrofobicità e la motilità. Uno dei più importanti fattori è rappresentato dalla motilità mediata dai flagelli di *E. coli* nelle fasi iniziali della formazione di biofilm.

- Adesione: è la seconda fase ed è caratterizzata dalla formazione di un legame irreversibile. È influenzata dalla presenza di strutture superficiali, come le adesine fimbriali. Esistono diverse classi di adesine che intervengono in questa fase (fimbrie di tipo 1, fibre curli, pili di tipo 4, fimbrie F9).
- Maturazione: durante la maturazione del biofilm i batteri continuano a moltiplicarsi e a produrre matrice extracellulare. In questa fase il biofilm acquisisce una struttura tridimensionale. Questa crescita è dovuta al legame tra batteri, mediati da diverse proteine di superficie e da componenti della matrice extracellulare. In *E. coli* i due fattori principali sono gli autotrasportatori per il legame tra le cellule e gli esopolisaccaridi (EPS) per la struttura della matrice.
- Dispersione: lo step finale della formazione del biofilm è il distacco delle cellule batteriche e la dispersione con conseguente diffusione dei batteri. La dispersione è una fase complessa, determinata da diversi segnali e non esiste un solo meccanismo. In *E. coli* la modulazione delle strutture di superficie, come i pili di tipo IV o le fimbrie AAFs, determinano un distacco dei batteri dalla superficie.

La formazione di biofilm è un evento complesso che può coinvolgere molte specie e diversi fattori e la scoperta che anche fattori non dedicati all'adesione sono importanti nella formazione di biofilm ha evidenziato la sua natura multifattoriale: in ceppi di *E. coli* EAEC atipici è stato descritto un meccanismo di formazione del biofilm indipendente alla presenza del fattore fimbriale AAF. In questi ceppi la formazione di biofilm è mediata da pili codificati dal plasmide di tipo IV. I pili di tipo IV sono coinvolti in numerosi fenotipi di batteri Gram negativi patogeni, che comprendono adesione cellulare, movimenti contrattili e coniugazione (Haussler and Fuqua 2013; Pereira et al, 2010).

In aggiunta a questo meccanismo, i pili codificati dal gene *tra* sono coinvolti nella coniugazione batterica mediata dal plasmide F. Queste appendici cellulari flessibili della lunghezza di circa 5 μm

sono espressi durante la fase di crescita e rendono le cellule, in stato planctonico, in grado di formare biofilm, permettendo contatti e interazioni intercellulari e con superfici abiotiche (Marti et al, 2017): è stato dimostrato che *E. coli* che trasportano questi plasmidi sono in grado di formare biofilm complessi sfruttando nelle fase iniziali i pili F, mentre *Escherichia coli* che ne sono privi sono in grado di sviluppare forme di biofilm estremamente deboli (Pereira et al, 2010).

Fattori di adesione sono diffusi soprattutto in ceppi intestinali agenti di forme diarroiche, come i ceppi DEC (diarrhegenic group of *E. coli*), che si caratterizzano per una diffusa aderenza alle cellule epiteliali: i principali fattori che influenzano l'insorgenza di biofilm in questi ceppi sono rappresentati da adesine della famiglia *Afa/Dr*, che comprendono anche adesine riscontrate in numerosi ceppi uropatogeni (Mansan-Almeida et al, 2013).

L'adesione tra le cellule è mediata da una varietà di proteine prodotte da *E. coli* e definite come adesine autotrasportatrici, che fanno parte del Tipo V del sistema di secrezione. Queste adesine sono codificate da nove geni, in parte a livello cromosomiale (*agn43*, *cah*, *ehaA*, *ehaB*, *ehaD*, *ehaG*, *saa*, *sab*) e uno a livello plasmidico (*espP*) (Vogeleer et al, 2014). Quella più studiata è rappresentata da una proteina di membrana, detta Antigene 43 (Ag43), codificata dal gene *agn43*, che è stata identificata come il principale fattore responsabile dell'aggregazione di *E. coli* e che agisce promuovendo l'adesione e l'aggregazione tra le cellule nelle fasi iniziali della formazione del biofilm (Marti et al, 2017). L'aggregazione cellulare è determinata dall'interazione tra queste proteine (Ag43-Ag43). Questa proteina è stata identificata per la prima volta nel ceppo di *E. coli* W3110, nel quale facilita la formazione di biofilm, soprattutto in presenza di glucosio. Il singolo gene *agn43* codifica per una proteina che è processata in due subunità separate (α - e β -): la subunità β è una proteina costituente la membrana esterna che permette la traslocazione della subunità α - attraverso la membrana stessa (Matheus-Guimarães et al, 2014).

La sottofamiglia di adesine, che comprende l'Ag43, include anche altre due adesine prodotte da *E. coli* che intervengono nella formazione di biofilm. La prima, AIDA-I, è una adesina che è prodotta da alcuni *E. coli* agenti di forme diarroiche, che permette l'adesione ad una grande varietà cellulare

sia in forma glicosilata sia mediante un'interazione diretta tra le adesine (AIDA-AIDA). È stato inoltre dimostrato il possibile legame tra la proteina AIDA e l'antigene Ag43, con formazione di aggregati cellulari (Sherlock et al, 2004). Un'altra adesina è la *TibA*, che è prodotta da alcuni ceppi di *E. coli* enterotossigeni: la *TibA* è una glicoproteina e la sua glicosilazione è essenziale per consentire l'aderenza di *E. coli* alle cellule, ma la glicosilazione non è richiesta per l'adesione tra le cellule batteriche (TibA-TibA) (Matheus-Guimarães et al, 2014).

I lipopolisaccaridi (LPS) e la capsula sono implicate nella formazione di biofilm in *E. coli*: mutazioni nel corso della sintesi degli LPS intervengono nell'aderenza alla superficie e quindi nella formazione di biofilm, mentre la capsula agisce mascherando le adesine di superficie e spesso ha un ruolo indiretto nella formazione di biofilm, anche se ancora poco conosciuto (Vogeleer et al, 2014; Nakao et al, 2012).

I principali costituenti della matrice del biofilm di *E. coli* sono fibre proteiche (curli) e flagelli, e una cellulosa polisaccaridica (Sharma et al, 2016). Ulteriori componenti della matrice biofilm, in alcuni ceppi, sono la beta-1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA) e l'acido colanico (Hobley et al, 2015). Le proteine che principalmente costituiscono la matrice del biofilm in *E. coli* sono le fibre "curli" e sono di tipo amiloide: queste fibre sono codificate da due diversi operoni (*csgBAC* e *csgDEFG*) e sono composte da due proteine (*CsgA*, maggiormente rappresentativa, e *CsgB*); l'operone *csgBAC* codifica per le due componenti delle fibre strutturali, *CsgA* e *CsgB*, per la proteina periplasmatica *CgsC*, per due proteine accessorie (*CgsE* e *Cgsf*) e la proteina traslocatrice *CsgG* (Vogeleer et al, 2014). La matrice può essere composta anche da 3 diversi EPSs: la poli-N-acetil glucosamina (PGA), l'acido colanico e/o la cellulosa, i cui geni sono presenti nel genoma di numerosi *E. coli* (Vogeleer et al, 2014). Un'ulteriore componente della matrice del biofilm di *E. coli* è rappresentata dalla cellulosa, ovvero un polimero organico, generalmente abbondante in natura, con una struttura relativamente semplice. La cellulosa, le cui proteine sono codificate da due diversi operoni (*yhjR-bcsQABZC* e *bcsEFG*), interviene nella connessione tra le superfici cellulari e viene sintetizzata dai batteri durante la formazione di biofilm (LeQuere et al, 2009).

Cap. 10- Materiali e metodi

10. 1- Raccolta dei campioni

Durante il periodo tra febbraio 2016 e luglio 2017 sono stati raccolti 500 campioni, provenienti dalla filiera suina, così distribuiti:

- 200 campioni di feci;
- 200 campioni prelevati da carcasse;
- 100 campioni di alimenti (carne di suino) destinati al consumo umano.

I campioni raccolti provenivano da suini allevati in modo intensivo, nelle regioni Emilia Romagna e Lombardia.

I campioni di feci sono stati prelevati durante la fase di sosta al macello: ciascun campione è stato raccolto mediante l'utilizzo di tamponi sterili (tamponi rettali), per un totale di 1 grammo, e successivamente mantenuti a una temperatura di 8°C +/-2°C, fino all'arrivo in laboratorio.

Le carcasse sono state campionate secondo quanto previsto dal Reg. CE 2073 del 2005 e smi, Allegato I Cap. 3, che identifica la norma UNI ISO 17604:2015 come riferimento per il metodo di campionamento (non distruttivo), la scelta dei siti di prelievo, le regole per la loro conservazione e il trasporto. I campioni sono stati raccolti tramite l'utilizzo di spugne abrasive imbevute con 10 ml di soluzione sterile e contenute in appositi sacchetti (SaniSponge, VWR Chemicals, Italia). Sono state prelevate, in ogni sessione di campionamento, 5 carcasse, al termine della macellazione e prima del raffreddamento. Al termine del prelievo la spugnetta è stata riposta nel proprio sacchetto ed è stato aggiunto il terreno di pre-arricchimento specifico (Buffered Peptone Water, BPW, Biolife Italiana, Italia), fino a un volume totale di 25 ml. Al termine dell'attività di campionamento, i campioni sono stati chiusi ermeticamente, identificati e conservati a una temperatura di trasporto di +8 °C +/- 2°C.

I 100 campioni di alimenti sono stati raccolti in collaborazione con la sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Sono stati oggetto di campionamento alimenti a base di carne suina, in particolare salsicce, per un totale di 50 campioni, e tagli di carne (totale 50).

10. 2 - Isolamento di *Escherichia coli* dai tamponi rettali

I tamponi rettali sono stati addizionati a 9 ml di Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife Italiana) e incubati per 4 ore in termostato a 37° C. Successivamente, 10 µl di brodocoltura sono stati seminati su piastre di MacConkey Agar (Biolife Italiana), un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento degli enterobatteri e la differenziazione dei coliformi (batteri fermentanti il lattosio) dagli enterobatteri patogeni non fermentanti il lattosio (Fig. 9).

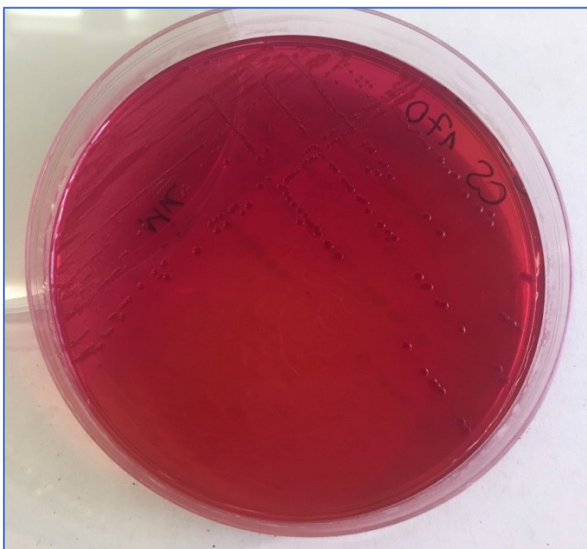


Fig. 9: Isolamento di *Escherichia coli* su MacConkey Agar: le colonie rosso-viola sono considerate tipiche (Foto dell'Autore).

L'azione selettiva del terreno è dovuta alla presenza di sali biliari, che inibiscono la crescita dei Gram positivi, e del cristal violetto. L'acidificazione del terreno e precipitazione dei sali biliari assorbimento del colore (rosso neutro) è data dalla capacità dei coliformi di fermentare il lattosio. Le

piastre sono state incubate a 37° C per 18 +/- 2h. Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo ATCC 25922 (*Escherichia coli*).

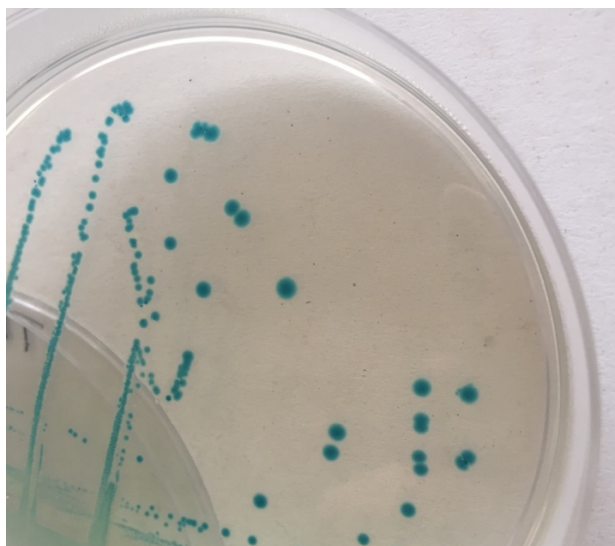


Fig. 10: Isolamento di *Escherichia coli* su TBX agar: le colonie blu-verdi sono considerate tipiche (Foto dell'Autore).

10. 3 - Isolamento di *Escherichia coli* dalle carcasse

Ai sacchetti contenenti le spugne, sono stati addizionati 225 ml di BPW e questi sono stati incubati a 37° C overnight. Al termine, le brodoculture sono state seminate su piastre di Tryptone Bile X-Gluc Agar (TBX Agar, Biolife Italiana), un terreno previsto dalla norma UNI ISO 16649:2, per la conta degli *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi nei campioni provenienti da alimenti. Dopo la semina, le piastre sono state incubate a 44° C per 24h. Questo terreno, di tipo cromogenico, è selettivo per la presenza di sali biliari inibitori di batteri Gram positivi. L'azione differenziale è data dall'idrolisi del substrato cromogenico X-Gluc (5-bromo-4cloro-3-indoli- β -D-glucuronide) da parte dell'enzima β -glucuronidasi (Fig. 10). Come controllo positivo è stato utilizzato l'ATCC 25922 (*Escherichia coli*).

10. 4 - Isolamento di *Escherichia coli* dagli alimenti

L'isolamento è stato condotto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Reggio Emilia, mediante applicazione della norma UNI ISO 16649:2 per la conta degli *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi nei campioni provenienti da alimenti.



Fig. 11: Galleria API 20E tipica per *Escherichia coli* (Foto dell'Autore).

10. 5 - Identificazione delle colonie tipiche

Dalle piastre, per ciascun campione, è stata isolata una colonia considerata tipica per *E. coli* ed è stata seminata su terreno nutritivo di base, il Tryptic Soy Agar (TSA, Biolife Italiana). Le piastre sono state incubate a 37° C +/- 2° per 18 h. Successivamente si è proceduto all'identificazione delle colonie isolate mediante gallerie biochimiche (Fig. 11), seguendo le istruzioni del produttore (API 20E, bioMerieux).

10. 6 – Valutazione della resistenza alle cefalosporine

Per ogni isolato di *E. coli* è stata testata la resistenza a due cefalosporine, cefotaxime (5 µg) e ceftazidime (10 µg) (Biolife Italiana), mediante antibiogramma. Per ogni isolato è stata preparato l'inoculo sospendendo 4-5 colonie, coltivate su TSA, in 5 ml di Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife Italiana). L'inoculo è stato incubato per 2-4 ore e in seguito è stato seminato, mediante tamponi sterili, su piastre di Mueller Hinton Agar (MHG, Mueller Hinton Agar II, Biolife Italiana); sulla superficie delle piastre sono stati depositati i dischetti di antibiotici e le piastre sono state incubate per 20 h a 37° C.

10. 7 - Test di conferma fenotipica per ESβL

I campioni che hanno mostrato resistenze alle due cefalosporine testate, cefotaxime e ceftazidime, sono stati sottoposti a test di conferma fenotipica mediante Combination Disk Test (CDT), secondo quanto previsto da EUCAST. Sono state selezionate 3 colonie, per ciascun campione, precedentemente seminato su TSA, e sono state diluite in 5 ml di Mueller Hinton Broth (MHB, Biolife Italiana) e incubate per 3 ore a 37° C.

In seguito, la brodocoltura è stata seminata su piastre di Mueller Hinton Agar, come previsto dalla metodica EUCAST, e sulla superficie sono stati depositati i dischetti antibiotici. I dischetti utilizzati (Biolife italiana) contenevano: cefotaxime 30 µg, ceftazidime 30 µg, cefepime 30 µg, cefotaxime 30 µg associato a clavulanato 10 µg, ceftazidime 30 µg associato a clavulanato 10 µg e cefepime 30 µg associato a clavulanato 10 µg. Le piastre sono state incubate a 37°C per 18 +/-2h (Fig. 12). L'esito è stato determinando confrontando la dimensione degli aloni del dischetto con il solo antibiotico e di quello con l'associazione con il clavulanato.

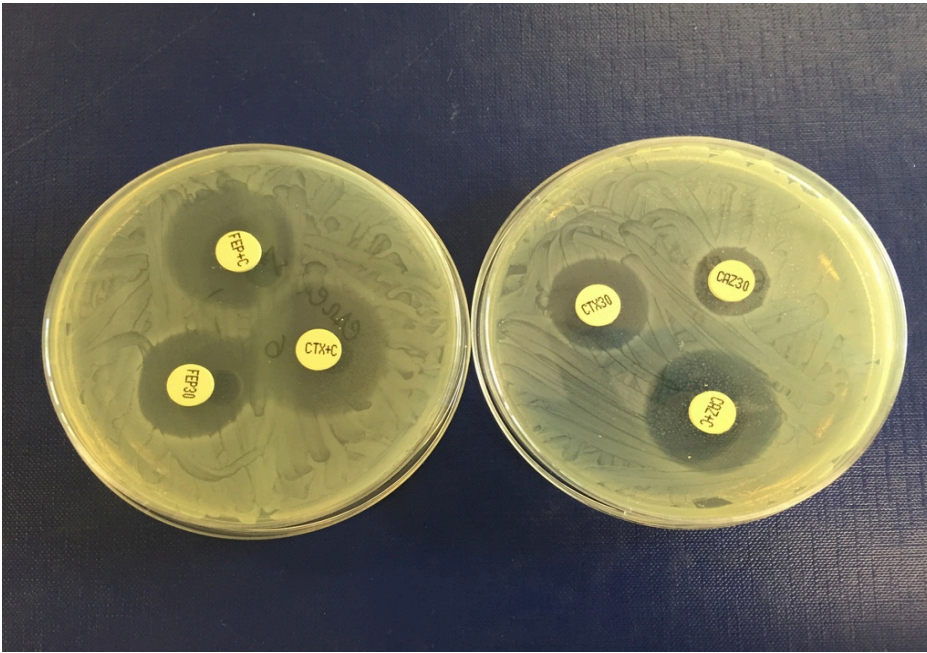


Fig. 12: Esecuzione CDT mediante metodo con dischetto per screening AmpC e conferma ES β L (Foto dell'Autore).

10. 8 – Valutazione della minima concentrazione inibente

Gli isolati risultati produttori a livello fenotipico di ES β L sono stati testati per valutare la minima concentrazione inibente (MIC) per un pannello di antibiotici previsto da EUCAST (Sensititre Plate, Thermoscientific, Italia).

L'inoculo è stato preparato emulsionando 5 colonie di ciascun campione in acqua sterile, regolando con uno standard di 0,5 McFarland e in seguito sono stati trasferiti 10 μ l della sospensione in un flacone da 11ml di brodo Mueller-Hinton regolato con tampone TES (Brodo di Mueller Hinton Sensititre, Thermoscientific). La brodocultura (50 μ l) è stata trasferita in micropiastra contenente le diluizioni degli antibiotici da testate e le piastre sono state incubate a 37° C per 24 h.

10. 9 - Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dei ceppi risultati produttori di ES β L al CDT è stata effettuata mediante bollitura (Tellevik et al, 2016). I campioni sono stati isolati su TSA e sono state prelevate 3 colonie da ciascuna piastra. Le colonie sono state stemperate in 1 ml di acqua bidistillata sterile in provette per microcentrifuga. Le provette sono state sottoposte a trattamento termico e portate ad ebollizione a 95° per 15 minuti. Successivamente le provette sono state centrifugate e è stato prelevato il surnatante.

10. 10 - Real Time PCR

Per la ricerca dei geni *bla*CTX-M, *bla*TEM e *bla*SHV è stato applicato il protocollo proposto da Tellavik (2016). In breve, è stata preparata la reazione così composta: 1xSybr Green (ITaq Universal SyBr Green, Bio-Rad), 0,5 μ M di ciascun primer (PrimePCR SYBR Custom Assay, Desalt, Bio-Rad) (Tabella 6), 2 μ l di DNA campione e acqua distillata sterile fino al volume finale di 25 μ l. La PCR Real Time è stata eseguita utilizzando il termociclatore CFX96 (Bio-Rad), con le seguenti condizioni di corsa: 95°C per 30 secondi, 35 cicli a 95°C per 10 secondi, 60°C per 10 secondi e 72°C per 30 secondi ciascuno, e successivamente raffreddamento a 40°C per 30 secondi. Ogni corsa è stata eseguita con un controllo positivo per ciascun gene, un controllo negativo e un No Template Control (NTC) (Tabella 7). Ogni campione, compresi i controlli, è stato replicato 4 volte per ogni corsa.

GENE		SEQUENZA
<i>bla</i> CTX-M	CTX-M F	CGATGTGCAGTACCAGTAA
	CTX-M R	TTAGTGACCAGAATCAGCGG
<i>bla</i> SHV	SHV F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA
	SHV R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT
<i>bla</i> TEM	TEM F	GCATCTTACGGATGGCATGA
	TEM R	GTCCTCCGATCGTTGTCAGAA

Tabella 6: Sequenze dei primer utilizzati (Tellavik et al, 2016).

NTCT/ATCC	CONTROLLO	GENE
NCTC 13353 <i>Escherichia coli</i>	Positivo	<i>bla</i> CTX-M
NCTC 13351 <i>Escherichia coli</i>	Positivo	<i>bla</i> TEM
NCTC 13368 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	<i>bla</i> SHV
ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>	Negativo	-

Tabella 7: Elenco dei ceppi di controllo utilizzati nella PCR Real Time.

10. 11 - Valutazione della produzione di biofilm in piastra

I campioni risultati produttori di ES β L sono stati testati per valutare la capacità di produrre biofilm *in vitro* (Maheshwari et al, 2016; Stepanović et al, 2007).

Da piastre di TSA, sono state prelevate 5 colonie e sono state seminate in 3 ml di TSB con l'aggiunta di glucosio all'1% (VWR International) e le provette sono state incubate per 24 h a 37° C.

In seguito, dalle brodoculture sono stati prelevati 200 μ l e sono stati distribuiti in micropiastre a 96 pozzetti in poliestilene con fondo piatto, non trattate, come previsto da Stepanović (2009) (VWR International). Le piastre sono state preparate incubate a 37° C per 24 h.

In seguito, è stato eliminato il surnatante e sono stati eseguiti 3 passaggi di lavaggio con acqua bidistillata sterile (300 μ l a pozzetto) e le piastre sono state fatte asciugare, capovolte per 1 ora a 60°C. Al termine, in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 μ l di cristal violetto all'1% (VWR International), e le piastre sono state lasciate a temperatura ambiente al buio per 15 minuti.

L'eccesso di colore è stato eliminato ed è stato effettuato un lavaggio con acqua bidistillata sterile (300 μ l) seguito da un lavaggio con 200 μ l di etanolo al 95% (VWR International). Dopo aver eliminato l'etanolo le piastre sono state fatte asciugare a 60° C per 1 ora e successivamente lette mediante spettrofotometro (ViktorX3, PerkinElmer) a una densità ottica (Optical Density, OD) di 595 nm. La prova è stata ripetuta per tre volte e per ogni campione sono stati allestiti tre replicati. Il

controllo negati utilizzato è stato TSB addizionato a glucosio 1% non seminato e come controllo positivo *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Cap. 11- Risultati

11. 1 – Risultati ottenuti dai tamponi rettali

Dai 200 tamponi rettali raccolti sono stati isolati altrettanti *E. coli*, sottoposti ad antibiogramma per la ricerca di resistenze alle due cefalosporine testate: 56 stipiti hanno mostrato resistenza (28%), in particolare, di questi isolati 50 (25%) sono risultati resistenti al cefotaxime da 5 µg (breakpoint < 17) e 25 isolati (12,5%) al ceftazidime da 10 µg (breakpoint < 19).

I 56 isolati resistenti sono stati sottoposti al Combination Disk Test, come previsto da CLSI, ed è stata ipotizzata la presenza a livello fenotipico di ESβL in 44 campioni (22% su 200 campioni). I ceppi sono stati sottoposti anche alla valutazione della resistenza al cefepime da 30 µg: 3 isolati hanno mostrato resistenza contemporanea al cefepime, al cefotaxime e al ceftazidime, con diametri delle associazioni all'acido clavulanico ≥ 5 mm, mentre un solo isolato ha mostrato la contemporanea resistenza cefotaxime e cefepime, confermando la produzione di ESβL. Dei 44 isolati analizzati, 16 hanno mostrato una possibile resistenza alla cefalosporina (cefotaxime e ceftazidime) associata all'acido clavulanico. Gli esiti delle MIC per i singoli stipiti sono riportati nella Tabella 7.

La ricerca dei tre geni di resistenza (*bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV) mediante PCR Real Time ha mostrato in 28 ceppi su 44 (63,6%) la presenza del gene *bla*CTX-M, con valori di Ct compresi tra 22,05 e 27,49. La presenza dei geni *bla*TEM e *bla*SHV, è stata evidenziata rispettivamente in 19 stipiti su 44 (43,2%), con valori di Ct compresi tra 21,53 e 28,36 e 3 isolati su 44 (6,8%), con valori di Ct tra 25,41 e 27,45. In 5 ceppi è stato possibile riscontrare la presenza in contemporanea dei geni *bla*CTX-M e *bla*TEM. La contemporanea presenza dei geni *bla*CTX-M e *bla*SHV è stata evidenziata in un solo campione, così come quella dei geni *bla*TEM e *bla*SHV (1/44).

	Prv	MERO	AMI	GEN	AZT	CIP	P/T	AUGC	C/T	COL	TGC	STX	TOB	CZA	IMI	ETP
AS 156	RE	0,25	32	8	32	2	8	8	0,5	1	0,25	8	4	0,5	0,5	0,12
AS 155	RE	0,12	16	8	32	2	4	4	16	1	4	32	2	1	0,5	0,25
AS 149	RE	0,12	16	4	32	0,12	32	32	32	1	0,25	8	4	16	0,5	0,25
AS 146	RE	0,12	8	2	32	0,5	32	64	32	1	0,5	4	2	8	0,5	0,12
AS 137	RE	0,12	4	2	32	0,06	8	4	1	1	0,25	8	8	4	1	0,25
AS 117	PR	2	32	8	8	1	8	16	2	1	4	8	4	8	1	0,5
AS 116	BG	0,25	32	4	16	0,12	4	4	0,5	2	2	8	2	1	0,5	0,12
AS 112	BG	0,25	16	4	32	1	4	4	1	2	0,25	8	2	2	2	0,25
AS 111	BG	0,12	32	8	32	2	8	8	0,5	8	4	8	8	4	0,5	0,5
AS 109	BG	1	16	4	32	1	8	16	1	1	1	8	1	8	1	1
AS 108	BG	0,25	4	2	32	2	2	8	1	2	1	8	1	4	2	0,25
AS 107	BG	1	16	8	32	2	32	16	32	2	4	8	4	16	2	0,5
AS 103	MI	1	16	8	32	2	8	4	16	1	4	8	1	16	2	0,5
AS 99	MI	1	32	8	32	2	2	4	0,5	1	0,25	8	8	2	0,5	0,12
AS 95	MI	0,12	4	4	32	2	1	2	0,5	0,5	4	8	1	0,5	1	0,12
AS 91	MI	0,12	4	1	8	0,5	4	4	1	0,5	1	4	1	2	0,5	0,12
AS 90	MI	0,12	4	2	32	0,25	8	8	1	1	0,5	8	8	0,5	0,5	0,12
AS 87	MI	4	4	2	32	0,25	16	8	1	0,5	0,25	4	1	8	0,5	0,5
AS 83	MI	4	32	8	32	2	32	32	16	4	4	8	2	16	1	0,25
AS 82	MI	0,12	4	1	4	0,12	16	64	2	0,2	0,25	8	1	16	0,5	0,12
AS 79	MI	2	32	8	32	2	32	64	32	4	4	8	8	16	2	0,5
AS 78	MI	8	16	8	32	2	2	4	0,5	8	4	8	8	2	2	2
AS 77	MI	2	32	8	32	1	16	16	1	2	4	8	8	4	1	0,25
AS 64	MN	1	16	8	32	1	2	8	0,5	8	0,5	8	1	4	0,5	0,25
AS 63	MN	1	16	2	8	2	8	8	1	2	4	8	8	4	1	0,25
AS 55	MN	0,25	32	8	32	0,5	32	16	32	8	2	4	4	16	0,5	0,5
AS 54	MN	2	32	8	16	1	16	8	16	4	4	8	1	2	0,5	0,5
AS 45	MN	0,5	16	4	8	2	2	4	1	1	0,25	8	2	2	2	1
AS 39	MN	4	32	8	32	2	32	4	1	2	2	8	4	4	1	0,5
AS 34	BS	1	16	4	8	1	8	8	0,5	2	2	8	4	2	0,5	0,25
AS 32	BS	1	32	8	32	2	8	8	1	4	4	8	2	2	1	0,5
AS 21	MN	0,25	32	2	8	1	8	8	1	1	4	8	4	4	0,5	0,25
AS 20	MN	16	32	8	32	2	32	64	32	8	4	8	8	16	16	2
AS 17	MN	8	32	8	32	2	8	8	1	8	4	8	8	8	1	1
AS 16	MN	4	16	4	4	1	16	32	32	4	4	8	2	16	1	0,5
AS 14	MN	0,25	4	2	4	2	32	16	8	2	4	8	2	8	0,5	0,25
AS 13	MN	0,25	16	8	32	2	32	16	8	2	2	8	4	16	4	1
AS 10	MN	0,25	4	4	4	0,5	8	4	8	2	4	8	4	2	0,5	0,25
AS 9	MN	0,25	32	8	32	2	16	8	8	4	2	8	8	16	4	2
AS 8	MN	2	32	8	32	2	8	8	1	8	2	8	4	4	0,5	0,25
AS 6	MN	4	32	8	32	2	8	8	1	8	4	8	8	16	0,5	2
AS 4	MN	1	32	8	32	2	8	8	0,5	8	4	8	8	4	1	0,25
AS 3	MN	1	16	8	32	2	32	16	32	4	2	8	2	16	0,5	0,5
AS 1	MN	2	32	8	32	1	8	8	8	0,5	2	8	8	16	0,5	2

Tabella 8: Esiti MIC con micrometodo dei tamponi rettali e provincia di provenienza dei campioni (Prv). Gli antibiotici testati sono stati; meropenem (MERO; $S \leq 0,25 - R > 8$), amikacina (AMI; $S \leq 8 - > 16$), gentamicina (GEN; $S \leq 2 - > 4$), azitromicina (AZT; $S \leq 1 - R > 4$), ciprofloxacina (CIP; $S \leq 0,25 - R > 0,5$), piperacillina/tazobactam (P/T4; $S \leq 8 - R > 16$), amoxicillina/ac. clavulanico (AUGC, $S \leq 8$); ceftolozane/tazobactam4 (C/T, $S \leq 1$); colistina (COL, $S \leq 2$); tigeciclina (TGC; $S \leq 1 - R > 2$); sulfametossazolo/trimethoprim (SXT; $S \leq 2 - R > 4$); tobramicina (TOB; $S \leq 2 - R > 4$); ceftazidime/tazobactam (CZA; $S \leq 8$); imipenem (IMI; $S \leq 2 - R > 8$); ertapenem (ETP; $S \leq 0,5$; $R > 1$).

In nessun caso è stata rilevata la contemporanea presenza dei tre geni in esame. Solo due ceppi non possiedono nessun gene ricercato.

La capacità di produrre biofilm è stata rilevata in 5 ceppi su 44: 3 isolati hanno mostrato una debole capacità di formare biofilm (OD: 0,0823035 - 0,089539744 -0,090168689), un ceppo ha mostrato

una moderata capacità a formare biofilm (OD: 0,153130933) e un isolato ha mostrato una forte capacità a produrre biofilm (OD: 0,302528556) (Tabella 11).

11. 2- Risultati ottenuti dai campioni provenienti da carcasse al macello.

In tutti i 200 campioni è stata rilevata la presenza di *Escherichia coli*, che sono stati indagati per valutare la resistenza alle cefalosporine in esame. Al cefotaxime da 5 µg hanno dato resistenza 34 ceppi su 200 (17%), mentre 12 stipiti (6%) hanno mostrato resistenza verso il ceftazidime da 10 µg. Gli isolati sono stati sottoposti al Combination Disk Test ed è stata ipotizzata la produzione di ESβL in 20 di questi (10% su 200 campioni). Un solo isolato ha mostrato resistenza al cefepime e, in contemporanea, al cefotaxime e ceftazidime. Dei 20 isolati, 6 hanno mostrato una resistenza alla cefalosporina associata all'acido clavulanico.

Nei ceppi risultati produttori di ESβL è stata condotta la valutazione della MIC con micrometodo, i cui risultati per i singoli campioni sono riportati in Tabella 9.

I risultati ottenuti dalla PCR Real Time hanno mostrato la presenza in 18 stipiti su 20 del gene *bla*CTX-M con valori di CT compresi tra 21,34 e 27,89; in 6 stipiti è stata rilevata la presenza del gene *bla*TEM e 4 ceppi hanno mostrato la contemporanea presenza dei geni *bla*CTX-M e *bla*TEM. Un solo isolato ha mostrato la presenza del gene *bla*SHV in concomitanza a *bla*CTX-M.

Su 20 ceppi testati uno solo ha mostrato una debole capacità a formare biofilm (OD: 0,093) (Tabella 11).

	MERO	AMI	GEN	AZT	CIP	P/T	AUGC	C/T	COL	TGC	STX	TOB	CZA	IMI	ETP
CS 80	0,25	4	2	8	0,12	16	16	2	2	2	8	1	16	0,5	0,12
CS 82	0,5	32	8	32	1	8	8	1	1	4	4	4	2	0,5	0,12
CS 88	1	32	8	32	2	8	8	0,5	4	0,25	8	2	2	0,5	0,25
CS 91	0,5	4	8	32	2	4	8	1	1	8	4	8	4	1	0,5
CS 98	0,5	32	8	32	1	8	4	1	8	4	8	8	8	2	0,5
CS 105	0,5	32	8	32	2	32	16	32	8	2	8	1	16	1	1
CS 107	0,25	4	4	4	0,12	8	4	0,5	4	4	8	4	4	0,5	0,5
CS 108	0,5	32	8	32	2	4	4	0,5	4	4	8	8	1	1	0,5
CS 109	0,5	4	8	32	2	8	8	1	1	0,25	8	8	2	1	0,5
CS 110	2	32	8	32	2	2	8	1	8	4	8	8	4	0,5	0,5
CS 111	16	32	8	32	2	32	16	32	4	4	8	2	8	1	0,5
CS 115	0,25	4	1	8	0,06	4	8	1	0,25	0,25	2	1	1	0,5	0,12
CS 123	2	32	8	32	1	8	4	1	4	4	8	8	4	0,5	1
CS 124	1	8	4	32	2	8	8	1	2	2	4	4	4	0,5	0,25
CS 125	8	32	8	32	2	16	16	16	4	4	8	4	16	1	1
CS 134	1	4	8	32	2	32	16	32	1	1	8	4	8	0,5	0,5
CS 135	8	32	8	32	1	16	8	1	4	4	8	8	8	1	1
CS 160	16	32	8	32	2	32	64	32	8	4	8	8	16	16	2
CS 182	0,25	16	4	32	2	8	8	8	4	4	8	4	2	1	0,5
CS 187	4	32	8	32	2	16	8	1	4	1	8	4	1	0,5	0,5

Tabella 9: Esiti della prova di MIC con micrometodo per i campioni ottenuti da carcasse al macello. Gli antibiotici testati sono stati: meropenem (MERO; S≤0,25 – R>8), amikacina (AMI; S≤8 - >16), gentamicina (GEN; S≤2 - >4), azitromicina (AZT; S≤ 1 – R > 4), ciprofloxacina (CIP; S ≤ 0,25 – R >0,5), piperacillina/tazobactam (P/T4; S≤ 8 – R >16), amoxicillina/ac. clavulanico (AUGC, S ≤ 8); ceftolozane/talozobactam4 (C/T, S ≤ 1); colistina (COL, S ≤ 2); tigeciclina (TGC; S ≤ 1 – R > 2); sulfametossazolo/trimethoprim (SXT; S ≤ 2 – R>4); tobramicina (TOB; S ≤ 2 – R > 4); ceftazidime/tazobactam (CZA; S ≤ 8); imipenem (IMI; S ≤ 2 – R > 8); ertapenem (ETP; S ≤ 0,5; R > 1).

11. 3 – Risultati ottenuti dai campioni di alimenti.

Dai 100 campioni di alimenti testati sono stati isolati 98 *Escherichia coli*, di cui 48 isolati da tagli di carne (48/50) e 50 isolati da salsiccia suina (50/50), e ne è stata valutata la resistenza verso due cefalosporine, il cefotaxime da 5 µg e ceftazidime da 10 µg. Gli isolati testati hanno mostrato una resistenza al cefotaxime in 12 casi (12,2%) e al ceftazidime in 10 casi (10,2%). La contemporanea resistenza ai due antibiotici testati si è avuta nel 6,1% dei casi (6/98).

Si è proceduto alla conferma mediante CDT della produzione di ESβL ed è stata ipotizzata la resistenza a livello fenotipico in 9 isolati testati: i ceppi risultati produttori di ESβL appartenevano in 4 casi su 50 a campioni di salsiccia suina e in 5 casi su 48 a salsiccia di carne suina. In particolare, tutti i 9 ceppi sono risultati resistenti al cefotaxime da 30 µg e due di questi sono risultati resistenti anche al ceftazidime da 30 µg. Nessuno degli isolati testati ha mostrato resistenza al cefepime da 30 µg. Due isolati hanno mostrato resistenza al cefotaxime associato all'acido clavulanico.

I ceppi identificati come possibili produttori di ESβL sono stati saggiati per valutare la MIC con micrometodo (Tabella 10).

		MERO	AMI	GEN	AZT	CIP	P/T	AUGC	C/T	COL	TGC	STX	TOB	CZA	IMI	ETP
PS 26	T	1	32	4	32	1	4	4	1	1	2	8	1	0,5	1	0,5
PS 30	T	16	32	8	4	2	32	64	32	8	4	8	2	16	1	1
PS 31	T	0,25	32	8	32	0,5	8	4	1	1	4	8	8	4	0,5	0,5
PS 46	S	0,5	16	8	4	2	2	4	1	1	4	8	4	4	0,5	2
PS 47	S	0,25	8	2	32	2	8	8	1	4	2	8	8	8	0,5	0,25
PS 65	S	0,5	16	8	32	2	32	8	32	2	0,5	4	4	16	0,5	0,25
PS 66	S	16	32	8	32	2	16	8	1	4	4	8	4	8	0,5	0,5
PS 67	T	1	8	8	32	1	8	8	1	1	4	8	8	8	1	1
PS 68	T	0,12	16	4	16	0,5	4	4	2	4	0,25	4	1	0,5	1	0,5

Tabella 10: Esiti della prova di MIC con micrometodo per i campioni di alimenti a base di carne suina (T= taglio di carne; S= salsiccia). Gli antibiotici testati sono stati: meropenem (MERO; S≤0,25 – R>8), amikacina (AMI; S≤8 - >16), gentamicina (GEN; S≤ 2 - >4), azitromicina (AZT; S≤ 1 – R > 4), ciprofloxacina (CIP; S ≤ 0,25 – R >0,5), piperacillina/tazobactam (P/T4; S≤ 8 – R >16), amoxicillina/ac. clavulanico (AUGC, S ≤ 8); ceftolozane/tazobactam4 (C/T, S ≤ 1); colistina (COL, S ≤ 2); tigeciclina (TGC; S ≤ 1 – R > 2); sulfametossazolo/trimethoprim (SXT; S ≤ 2 – R >4); tobramicina (TOB; S ≤ 2 – R > 4); ceftazidime/tazobactam (CZA; S ≤ 8); imipenem (IMI; S ≤ 2 – R > 8); ertapenem (ETP; S ≤ 0,5; R > 1).

La ricerca dei geni di resistenza alle β-lattamasi a spettro esteso mediante PCR Real Time ha evidenziato la presenza del gene *bla*CTX-M in 6 stipiti con valori di CT compresi tra 22,27 e 25,75;

il gene *bla*TEM è stato rilevato in 4 ceppi su 9 con valori di CT compresi tra 20,01 e 22,35 e 2 isolati hanno mostrato la contemporanea presenza del gene *bla*TEM e di *bla*CTX-M. Il gene *bla*SHV è risultato presente in un solo ceppo (Ct 25.6).

I 9 ceppi testati non hanno mostrato capacità di produrre biofilm (Tabella 11).

Campioni CS	OD	Campioni PS	OD	Campioni AS	OD
CS 80	0,052838178	PS 26	0,049071111	AS 156	0,060309
CS 82	0,056454233	PS 30	0,052599122	AS 155	0,050483
CS 88	0,060159478	PS 31	0,052515989	AS 149	0,64831
CS 91	0,059009511	PS 46	0,057408244	AS 146	0,063851
CS 98	0,061898656	PS 47	0,051929956	AS 137	0,059711
CS 105	0,057903211	PS 65	0,052529078	AS 117	0,059438
CS 107	0,058745389	PS 66	0,063123822	AS 116	0,057914
CS 108	0,057952544	PS 67	0,052336356	AS 112	0,056334
CS 109	0,063190178	PS 68	0,050805511	AS 111	0,063603
CS 110	0,054416322			AS 109	0,059274
CS 111	0,050769656			AS 108	0,059274
CS 115	0,055051722			AS 107	0,040898
CS 123	0,051306922			AS 103	0,055611
CS 124	0,048128378			AS 99	0,050467
CS 125	0,053226433			AS 95	0,040678
CS 134	0,049489411			AS 91	0,032719
CS 135	0,056934922			AS 90	0,055611
CS 160	0,088076689			AS 87	0,041671
CS 182	0,0522662			AS 83	0,041245
CS 187	0,050787922			AS 82	0,045096
				AS 79	0,036051
				AS 78	0,035808
				AS 77	0,045919
				AS 64	0,04116
				AS 63	0,302529
				AS 55	0,090169
				AS 54	0,08954
				AS 45	0,041606
				AS 39	0,040688
				AS 34	0,040161
				AS 32	0,039211
				AS 21	0,038537
				AS 20	0,068401
				AS 17	0,082304
				AS 16	0,041613
				AS 14	0,054413
				AS 13	0,050183
				AS 10	0,047388
				AS 9	0,049177
				AS 8	0,042837
				AS 6	0,043558
				AS 4	0,047558
				AS 3	0,153131
				AS 1	0,048472

Tabella 11: Valori di OD dei campioni in esame. L'interpretazione dei valori è stata fatta considerando il controllo negativo (ODC: 0,07484). La tabella di riferimento è stata: $OD \leq ODC$ non aderente; $ODC < OD \leq 2ODC$ debole; $2ODC < OD \leq 4ODC$ moderato; $4ODC < OD$ forte.

Cap. 12- Discussione

L'incidenza del fenomeno dell'antibioticoresistenza non riguarda solo la medicina umana ma anche il comparto veterinario, a partire dall'allevamento fino ad arrivare all'alimento di origine animale e gli animali maggiormente coinvolti dal fenomeno sono rappresentati da avicoli, suini e bovini (ECDC/EFSA/EMA 2017; Carattoli A, 2008).

L'allevamento suino intensivo per lungo tempo ha utilizzato i trattamenti antibiotici non solo a fine terapeutico ma anche a livello profilattico, per prevenire la diffusione di patologie o per promuovere la crescita degli animali. Queste pratiche hanno favorito la selezione di ceppi resistenti, in particolare alle cefalosporine, che nel suino sono utilizzate soprattutto nel trattamento di forme respiratorie (Jorgensen et al, 2007). La resistenza di *Escherichia coli* alle cefalosporine, mediata da β -lattamasi a spettro esteso, presenta, in Europa, un'incidenza del 31,9% nei suini e in Italia il valore raggiunge il 40% dei casi (EFSA, 2017).

Nella prima parte di questo lavoro di tesi è stata considerata la capacità di *Escherichia coli*, isolati dalla filiera suina intensiva, di mostrare resistenza alle cefalosporine di III e IV generazione. I dati raccolti dal presente studio, per quanto riguarda l'incidenza degli *E. coli* produttori di ES β L nelle feci suine, hanno mostrato un'incidenza del 22%, allineandosi con i dati ufficiali. Nello screening eseguito inizialmente, gli *E. coli* isolati hanno mostrato una maggiore resistenza al cefotaxime da 5 μ g rispetto al ceftazidime da 10 μ g. Uno studio precedente, condotto su tamponi rettali provenienti da allevamenti intensivi di suini dell'Emilia Romagna, ha evidenziato la capacità di produrre ES β L nel 36% (20/56) degli isolati, dei quali il 75% era rappresentato da *E. coli* (Stefani et al, 2014).

I campioni prelevati durante la macellazione hanno rilevato la presenza, sulla superficie delle carcasse, di *E. coli* con resistenza alle cefalosporine. Lo screening iniziale ha evidenziato che i ceppi

isolati da 44 campioni sono resistenti; ha prevalso la resistenza al cefotaxime (17%) rispetto al ceftazidime (6%). La conferma mediante CDT si è avuta in 20 casi (10%).

La trasmissione di ceppi resistenti a seguito dall'assunzione di cibo contaminato, in particolare di alimenti crudi o poco cotti, è stata oggetto di numerosi studi (Chen et al, 2017; Randall et al, 2017). Diverse ricerche sottolineano il rischio determinato dalla carne avicola, che raggiunge alte percentuali di isolamento, mentre sono minori gli studi attualmente a disposizione per la carne suina (Kawamura et al, 2014; Ojer-Usoz et al, 2013). Nel 2014 in Danimarca, un monitoraggio nei tagli di carne avicola, suina e bovina ha evidenziato una prevalenza di *E. coli* produttori di ES β L rispettivamente del 83,8%, del 12,5% e del 3,7% (Carmo et al, 2014). In Europa è stata riportata un'incidenza di *E. coli* produttori di ES β L isolati dalla carne suina nel 7% dei casi, con le più alte prevalenze in Portogallo (21,6%) e in Bulgaria (20,8%) (EFSA, 2017). In Italia, sono stati raccolti 279 isolati di *E. coli* da carne suina e di questi 22 sono risultati produttori di ES β L (7,9%) (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

Nel presente studio, la ricerca di *E. coli* negli alimenti ha permesso di isolare *Escherichia coli* in 98 campioni sui 100 testati, di cui 16 resistenti alle cefalosporine allo screening iniziale, mostrando sempre una maggiore resistenza al cefotaxime, ma solo 9 ceppi (9,2%) sono stati identificati come produttori di ES β L con il CDT. Non si evidenziano differenze, relativamente alla produzione degli enzimi ES β L, in funzione della tipologia di alimento considerato.

La presenza di stipiti che al CDT hanno mostrato resistenza all'associazione cefalosporina e acido clavulanico nelle tre matrici considerate può essere indicativa della contemporanea presenza di cefalosporinasi, in prevalenza AmpC, che mascherano l'attività a livello fenotipico dei geni di tipo ES β L (EFSA, 2011): l'incidenza di *E. coli* produttori di enzimi di tipo AmpC nel suino è stata identificata nel 10,7% dei casi considerati in Italia e nel 9,7% dei casi in Europa (EFSA, 2017).

La prevalente resistenza al cefotaxime si accorda con quanto riportato da altri studi e dai report ufficiali. Il gene maggiormente diffuso in Europa e, in Italia in particolare, risulta essere *bla*CTX-M, che codifica per enzimi in grado di idrolizzare prevalentemente il cefotaxime, mentre inferiore è la

presenza dei geni *bla*TEM e *bla*SHV, che codificano per enzimi in grado di idrolizzare il ceftazidime (Fischer et al, 2014; Carattoli et al, 2008). Il monitoraggio condotto nel 2015 in Italia ha evidenziato la presenza del gene *bla*CTX-M (in prevalenza CTX-M-1) in tutti gli *E. coli* produttori di ESβL isolati da carne suina (22/279), mentre su 304 campioni di feci di suini allevati in modo intensivo, la prevalenza di *E. coli* produttori di β-lattamasi ha riguardato 195 campioni, 189 dei 195 campioni è stata identificata la presenza del gene *bla*CTX-M e solamente in 6 è stata rilevata la presenza del gene *bla*SHV (ECDC/EFSA/EMA, 2017). Nel presente studio, la valutazione della presenza dei 3 geni mediante PCR Real Time ha evidenziato una maggiore prevalenza del gene *bla*CTX-M in tutte e tre le matrici considerate. *Escherichia coli* isolati da due campioni di feci sono risultati negativi per i tre geni considerati; in tale circostanza si deve ipotizzare che altre β-lattamasi, non ricercate, conferiscano la resistenza a questi ceppi.

Negli isolati risultati produttori di ESβL mediante CDT è stata condotta la MIC verso un pannello di antibiotici (EUCAST), per definirne, a livello fenotipico, la multi-resistenza. I risultati ottenuti mostrano alti livelli di resistenza per antibiotici a lungo utilizzati nel trattamento delle patologie dell'allevamento suino: l'associazione sulfametossazolo/trimethoprim ha presentato i più alti livelli di resistenza (tra 70-90%) nelle tre matrici considerate e nessuno dei ceppi testati è risultato sensibile all'associazione antibiotica. Alcuni studi dimostrano che la somministrazione di questi antibiotici può determinare la comparsa di cloni con percentuali di resistenza comprese tra il 69% e il 100% (Gibbons et al, 2016; Mazurek et al, 2015). Nel presente studio sono state rilevate anche alte percentuali di resistenza alla gentamicina, con maggiore incidenza negli isolati provenienti da feci e da carcasse. Dati ufficiali sulla situazione epidemiologica in Italia mostrano una resistenza inferiore (4%) alla gentamicina negli stipiti isolati da feci suine, rispetto a quella rilevata in questo studio (56,8%); la resistenza al sulfametossazolo è riportata a livelli attorno al 72%, in accordo con quanto osservato nella nostra indagine, mentre i livelli di trimethoprim riportati per il 2015 in Italia si aggirano attorno al 58% (EFSA, 2017). I dati disponibili per l'Europa segnalano una prevalenza di resistenza al trimethoprim del 35,3%, del 44,2% al sulfametossazolo e del 3,3% alla gentamicina (EFSA, 2017).

Nel presente studio è stata testata la resistenza a livello fenotipico di tre carbapenemici con evidenza di bassi livelli di resistenza (meropenem: 2,2-22%; imipenem: 0-5%; ertapenem: 5-11%), con livelli maggiori per meropenem e imipenem nelle carcasse e per ertapenem nelle feci. Non sono disponibili dati ufficiali in merito alla presenza di *E. coli* resistenti a questi antibiotici. L'uso dei carbapenemici è attualmente vietato nella filiera zootecnica e la possibile presenza di resistenze a tali antibiotici potrebbe essere imputabile alla circolazione di geni codificanti carbapenemasi.

Colistina e ciprofloxacina sono due molecole utilizzate nel trattamento di numerose patologie e a scopo profilattico nell'allevamento suino. La presenza di resistenza può essere dovuta sia dall'utilizzo del farmaco sia dalla presenza di plasmidi che veicolano geni codificanti o ESBL o enzimi che inattivano questi antibiotici. Nel presente studio sono stati rilevati alti livelli di resistenza alla ciprofloxacina (56-85%), mentre inferiori sono stati i livelli di resistenza alla colistina (29,5-65%). Dati ufficiali, riportano in Italia valori di resistenza alla ciprofloxacina nettamente inferiori nel suino (15%) e alla colistina (0,6%) (EFSA, 2017). In Europa, i dati ufficiali riportano una resistenza dello 0,6% alla colistina e del 10,5% alla ciprofloxacina: va sottolineato che queste prevalenze sono ottenute da piani di monitoraggio a livello nazionale e che non tutti i Paesi riportano dati di resistenza per queste molecole (EFSA, 2017).

La resistenza verso gli altri antibiotici testati è stata elevata per l'amikacina (44-60%), con maggiore incidenza rilevata delle feci, e per l'azitromicina (77-95%): per l'amikacina non sono disponibili dati ufficiali nel suino, mentre in Italia è stata riportata un'incidenza del 1,8% (in Europa 2,8%) nelle feci suine per l'azitromicina.

In Italia non sono disponibili dati riguardanti la resistenza di *E. coli* isolati dal suino verso la tige ciclina, mentre i dati europei mostrano una resistenza dello 0,2%. I dati rilevati dal presente studio mostrano resistenze maggiori.

Gli *E. coli* oggetto della presente indagine hanno mostrato sensibilità nella maggioranza degli isolati alle associazioni tra antibiotici e inibitori delle β -lattamasi (piperacillina/tazobactam, amoxicillina/ac.clavulanico, ceftolozane/tazobactam e ceftazidime/tazobactam).

La resistenza verso piperacillina/tazobactam è stata evidenziata in 17 ceppi su 73, con prevalenza delle resistenze negli *E. coli* isolati dalle feci (11/17); la resistenza alla combinazione amoxicillina/ac. clavulanico è stata rilevata in 22 campioni su 73, di cui 15 isolati dalle feci, uno dagli alimenti e 6 dalle carcasse. La resistenza all'associazione ceftolozane/tazobactam è stata mostrata da ceppi isolati da 29 campioni su 73, di cui 19 isolati dalle feci, mentre la resistenza all'associazione ceftazidime/tazobactam è stata rilevata in 20 stipiti di cui 14 isolati dalle feci. La resistenza verso gli inibitori delle β -lattamasi può essere associata alla presenza di ulteriori geni di resistenza, come gli AmpC (Deepti and Deepthi, 2010).

La capacità di *E. coli* di veicolare geni di resistenza è sostenuta anche dalla capacità del patogeno di formare biofilm su numerose superfici: ciò permette ai batteri di entrare in contatto, nel corso del tempo, con altri microrganismi, determinando uno scambio continuo di elementi genetici mobili e la persistenza di possibili fonti di infezione (Maheshwari et al, 2016; Vogeleer et al, 2014). Nel presente lavoro è stata testata la capacità degli *E. coli* isolati di produrre biofilm: un solo ceppo ha mostrato una forte capacità di produzione, mentre uno ha mostrato una moderata capacità e quattro ceppi una debole capacità a formare biofilm. Quasi la totalità dei ceppi (5/6), capaci di produrre biofilm, sono stati isolati dai campioni di feci mentre un solo ceppo è stato isolato dalle carcasse suine. La presenza di tali ceppi pone l'attenzione su microrganismi presenti a livello intestinale (entroaggreganti), in grado di formare strutture complesse sulla mucosa e quindi di favorire la colonizzazione del tratto intestinale (García-Heredia et al, 2016; Vijay et al, 2015).

Conclusioni e prospettive future

In questo progetto di tesi è stata considerata la diffusione di *Escherichia coli* resistenti alle cefalosporine di III e IV generazione nella filiera suina in due regioni ad alta densità di allevamenti intensivi e macelli (Lombardia ed Emilia Romagna).

Lo studio delle prevalenze delle resistenze nella catena alimentare assume un ruolo fondamentale anche in vista dell'applicazione del Piano Nazionale di contrasto all'antimicrobico resistenza (2017-2020) e per valutare la circolazione di stipiti multiresistenti.

I monitoraggi condotti su campioni fecali hanno evidenziato nel corso degli anni una crescente diffusione di ceppi resistenti, con profili complessi, e attualmente riveste un ruolo fondamentale lo studio della circolazione di microrganismi patogeni e saprofiti resistenti agli antibiotici, soprattutto di importanza critica, anche negli alimenti (Projahn et al, 2016; EFSA, 2011). È indispensabile valutare il reale rischio per il consumatore e definire i meccanismi che sono alla base del passaggio di batteri resistenti dalla filiera zootecnica e alimentare all'uomo e viceversa: ad esempio, una delle categorie maggiormente a rischio è rappresentata dagli operatori della catena alimentare, soggetti ad un contatto diretto e quotidiano con l'ambiente contaminato (Dohmen et al, 2017; Fischer et al, 2017).

Lo scopo è quello di mappare il problema a livello locale, acquisendo un maggior numero di dati: infatti, i dati europei non sono disponibili per tutti i Paesi oppure sono disponibili per un ristretto numero di batteri o di matrici (EFSA, 2017).

In vista dell'obiettivo di ridurre di almeno il 10% l'utilizzo di antibiotici di importanza critica, comprese le cefalosporine di III e IV generazione, nell'allevamento, nel triennio 2017-2020, la valutazione delle resistenze dovrebbe essere fatta prendendo in considerazione anche i trattamenti antibiotici somministrati durante il ciclo produttivo: è innegabile, infatti, l'incidenza che ha avuto nel corso degli anni l'abuso di molecole antibiotiche usate sia a scopo terapeutico sia a scopo profilattico, in particolare nella filiera suina, nella selezione e della diffusione di ceppi antibiotico resistenti, soprattutto nei microrganismi saprofiti, come *E. coli*.

Bibliografia.

- Antunes P, Coque TM, Peixe L, 2010. «Emergence of an IncIgamma plasmid encoding CMY-2 ss-lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing ss-lactamase *Salmonella* Typhimurium multidrug-resistant clone» *J Antimicrob Chemother* 65: 2097-2100.
- Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D, 2002. «blaCTX-M-2 Is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513» *Antimicrob. Agents Chemother* 46: 2303–2306.
- Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, Nonhoff C, Roisin S, 2017. «Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes» *Antibiotics (Basel)*. 6 (2).
- Arvand M, Bettge-Weller G, Fruth A, Uphoff H, Pfeifer Y, 2015. «Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (stx1)-positive *Escherichia coli* O91:H14 carrying blaCTX-M-15 on an IncI1-ST31 plasmid isolated from a human patient in Germany» *Int J Med Microbiol* 305 (3): 404-7.
- Arzanlou M, Chai WC, Venter H, 2017. «Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria» *Essays Biochem* 61 (1): 49-59.
- Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P, 2001. «Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*» *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1615-1620.
- Bae IK, Lee YN, Lee WG, Lee SH, Jeong SH, 2007. «Novel Complex Class 1 Integron Bearing an ISCR1 Element in an *Escherichia coli* Isolate Carrying the blaCTX-M-14 Gene» *Antimicrob Agents Chemother* 51 (8): 3017-9.
- Baraniak A, Fiett J, Mrowka A, Walory J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, 2005. «Evolution of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical *Enterobacteriaceae* strains in Poland.» *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1872-1880.
- Baricco, G, P Bonilauri, P Borghetti, A Caleffi, P Candotti, E Canelli, S Cavigliani, et al. 2013. *Le Patologie del Maiale*. A cura di Martelli P. Vol. 1. Milano: Point Veterinariaire Italie.
- Ben-Ami R, Rodriguez-Bano J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, Calbo ES, Azap OK, Arpin C, Pascual A, Livermore DM, Garau J, Carmeli Y, 2009. «A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nonhospitalized patients. » *Clin Infect Dis* 49: 682-690.
- Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, Leavitt A, Carmeli Y, 2006. «Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital» *Clin Infect Dis* 42: 925-934.
- Beyrouthy R, Robin F, Hamze M, Bonnet R, 2017. «IncFIIk plasmid harbouring an amplification of 16S rRNA methyltransferase-encoding gene rmtH associated with mobile element ISCR2.» *J Antimicrob Chemother*. 72 (2): 402-406.
- Blaak H, Hamidjaja RA, van Hoek AH, de Heer L, de Roda Husman AM, Schets FM, 2014. «Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms» *Appl Environ Microbiol*. 80 (1): 239-46.

- Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miro E, Navarro F, Cortes P, Llagostera M, 2006. «ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms» *Vet Microbiol* 118: 299-304.
- Bortolaia V, Guardabassi L, Bisgaard M, Larsen J, Bojesen AM, 2010a. «*Escherichia coli* producing CTX-M-1, -2, and -9 group beta-lactamases in organic chicken egg production» *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3527-3528.
- Bortolaia V, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM, 2010b. «High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks» *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1623-1626.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R, 2005. «Biofilms: the matrix revisited.» *Trends Microbiol.* 13 (1): 20-6.
- Brinas L, Moreno MA, Teshager T, Zarazaga M, Saenz Y, Porrero C, Dominguez L, Torres C, 2003a. «Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain.» *Microb Drug Resist* 9: 201-209.
- Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Saenz Y, Garcia M, Dominguez L, Torres C, 2003b. «Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal- sample isolates from healthy chickens.» *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2056-2058.
- Brodrick HJ, Raven KE, Kallonen T, Jamrozny D, Blane B, Brown NM, Martin V, Török ME, Parkhill J, Peacock SJ, 2017. «Longitudinal genomic surveillance of multidrug-resistant *Escherichia coli* carriage in a long-term care facility in the United Kingdom» *Genome Med.* 9 (70).
- Bryan A, Youngster I, McAdam AJ, 2015. «Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*.» *Clin Lab Med* 35 (2): 247-272.
- Buelow E, Bello González TDJ, Fuentes S, de Steenhuijsen Piter WAA, Lahti L, Bayjanov JR, Majoor EAM, Braat JC, van Mourik MSM, Oostdijk EAN, Willems RJL, Bonten MJM, van Passel MWJ, Smidt, H, van Schaik W, 2017. «Comparative gut microbiota and resistome profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects.» *Microbiome* 5 (88).
- Bush K, Jacoby GA, 2010. «Updated functional classification of beta-lactamases.» *Antimicrob Agents Chemother* 54 (3): 969-76.
- Cameron-Veas K, Solà-Ginés M, Moreno MA, Fraile L, Migura-Garcia L, 2015. «Impact of the use of β -lactam antimicrobials on the emergence of *Escherichia coli* isolates resistant to cephalosporins under standard pig-rearing conditions.» *Appl Environ Microbiol.* 81 (5): 1782-7.
- Canton R, Coque TM, 2006. «The CTX-M beta-lactamase pandemic.» *Curr Opin Microbiol* 9: 466- 475.
- Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM, 2008. «Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe.» *Clin Microbiol Infect* 14 (1): 144-153.
- Carattoli A, 2008. «Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers» *Clin Microbiol Infect* 14 (1): 117-123.

- Carattoli A, 2009. «Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. » *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2227-2238.
- Carattoli A, García-Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, Mancini C, Giordano A, 2008. «Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy» *J Clin Microbiol*. 46 (1): 103-8.
- Carattoli A, 2013. «Plasmids and the spread of resistance» *Int J Med Microbiol*. 303: 298-304.
- Carmo LP, Nielsen LR, da Costa PM, Alban L, 2014. «Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark» *Infect Ecol Epidemiol* 4.
- Chattaway MA, Jenkins C, Rajendram D, Cravioto A, Talukder KA, Dallman T, Underwood A, Platt S, Okeke IN, Wain J, 2014. «Enteroaggregative *Escherichia coli* have evolved independently as distinct complexes within the *E. coli* population with varying ability to cause disease» *PLoS One* 9 (11).
- Chaubey M and Shenoy S, 2017. «Occurrence of TEM, SHV and CTX-M β lactamases in clinical isolates of *Proteus* species in a tertiary care center.» *Infect Disord Drug Targets*.
- Chen CM, Ke SC, Li CR, Wu YC, Chen TH, Lai CH, Wu XX, Wu LT. 2017. «High Diversity of Antimicrobial Resistance Genes, Class 1 Integrons, and Genotypes of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Beef Carcasses.» *Microb Drug Resist*.
- Chen Z, Niu H, Chen G, Li M, Li M, Zhou Y, 2015. «Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a Chinese teaching hospital.» *Int J Clin Exp Med*. 8 (10).
- Chiaretto G, Zavagnin P, Bettini F, Mancin M, Minorello C, Saccardin C, Ricci A, 2008. «Extended-spectrum beta-lactamase SHV-12-producing *Salmonella* from poultry.» *Vet Microbiol* 128: 406-413.
- Chin TL, McNulty C, Beck C, MacGowan A, 2106. «Antimicrobial resistance surveillance in urinary tract infections in primary care» *J Antimicrob Chemother*. 71 (10).
- Commissione Europea, 2004. «DIRETTIVA 2004/28/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 31 marzo 2004 che modifica la Direttiva 2001/82/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali veterinari»
- Commissione Europea, 2015. «Linee guida sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria 2015/C 299/04.»
- Commissione Europea, 2016. «Antimicrobial Resistance in the eu.» Report.
- Conlon BP, Rowe SE, Lewis K, 2015. «Persister cells in biofilm associated infections. » *Adv Exp Med Biol* 1-9.
- Control, European Centre for Disease Prevention, 2017. «Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015»
- Costa T, Linhares I, Ferreira R, Neves J, Almeida A. 2017. «Frequency and Antibiotic Resistance of Bacteria Implicated in Community Urinary Tract Infections in North Aveiro Between 2011 and 2014.» *Microb Drug Resist*.
- Cottell JL, Webber MA, Coldham NG, Taylor DL, Cerdeno-Tarraga AM, Hauser H, Thomson NR, Woodward MJ, Piddock LJ, 2011. «Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding blaCTX-M-14.» *Emerg Infect Dis* 17: 645-652.

- Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A, 2016. «New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry.» *Front Microbiol.*
- Coyne LA, Pinchbeck GL, Williams NJ, Smith RF, Dawson S, Pearson RB, Latham SM, 2014. «Understanding antimicrobial use and prescribing behaviours by pig veterinary surgeons and farmers: a qualitative study.» *Vet Rec.* 175 (23).
- Crivaro V, Bogdanović L, Bagattini M, Iula VD, Catania M, Raimondi F, Triassi M, Zarrilli R, 2015. «Surveillance of healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit in Italy during 2006–2010.» *BMC Infect Dis.*
- Crivaro V, Bogdanović L, Bagattini M, Iula VD, Catania M, Raimondi F, Triassi M, Zarrilli R, 2015. «Surveillance of healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit in Italy during 2006–2010.» *BMC Infect Dis* 15.
- Dakheel KH, Abdul Rahim R, Neela VK, Al-Obaidi JR, Hun TG, Yusoff K, 2016. «Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms and Their Influence on Bacterial Adhesion and Cohesion.» *Biomed Res Int.*
- Dalhoff A, Schubert S, Vente A, 2017. «Pharmacodynamics of Finafloxacin, Ciprofloxacin, and Levofloxacin in Serum and Urine against TEM- and SHV-Type Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections.» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (5): 1-10.
- Damjanova I, Toth A, Paszti J, Jakab M, Milch H, Bauernfeind A, Fuzi M, 2007. «Epidemiology of SHV-type β -lactamase-producing *Klebsiella* spp. from outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids.» *Int J Antimicrob Agents* 29: 665-671.
- Das, T., Sehar, S., and Manefield, M, 2013. «The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development.» *Environ Microbiol Rep* 5: 778–786.
- Davey ME, O'toole GA, 2000. «Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.» *Microbiol Mol Biol Rev.* 64 (4): 847-67.
- de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Lei Y, Li N, Tooming-Klunderud A, Heederik DJ, Fluit AC, Bonten MJ, Willems RJ, de la Cruz F, van Schaik W, 2014. «Dissemination of Cephalosporin Resistance Genes between *Escherichia coli* Strains from Farm Animals and Humans by Specific Plasmid Lineages.» *PLoS Genet.* 10 (12).
- Deepthi R. and Deepthi N, 2010. «Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria.» *J Glob Infect Dis* 2 (3): 263–274.
- Dewulf J, Catry B, Timmerman T, Opsomer G, de Kruif A, Maes D, 2007. «Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: degree of resistance, multiple resistance and risk factors.» *Prev Vet Med* 78: 339-351.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchia L, Rossolini GM, 2013. «CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance.» *Int J Med Microbiol* 303: 305–317.
- Diegoli G, Granito G, Luppi A, Masera F, Merialdi G, Miraglia V, Mussini P, Trevisi P, Trambajolo G, 2017. «Linee Guida: uso degli antibiotici nell'allevamento suino.»

- 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.
- Dohmen W, Bonten MJ, Bos ME, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, Heederik DJ, 2015. «Carriage of extended-spectrum β -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs.» *Clin Microbiol Infect* 21 (10): 917-23.
- Dohmen W, Dorado-García A, Bonten MJ, Wagenaar JA, Mevius D, Heederik DJ, 2017. «Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials.» *PLoS One*. 12 (3).
- Dohmen W, Schmitt H, Bonten M, Heederik D, 2017. «Air exposure as a possible route for ESBL in pig farmers.» *Environ Res*.
- Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA, 2017. «The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world.» *J Travel Med* 1 (24): 44-55.
- Donnenberg MS, 2013. *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (Second Edition). Elsevier.
- Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC, Nychas GJ, Sofos JN, 2011. «Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing.» *Int J Food Microbiol* 149 (3): 262-8.
- Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Matté GR, Matté MH, 2015. «Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil.» *J Infect Dev Ctries* 9 (8): 890-7.
- ECDC/EFSA/EMA, 2017. «ECDC/EFSA/EMA second 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.»
- ECDC/EMEA, 2009. «Technical Report. The bacterial challenge: time to react.»
- Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, Bethel CR, Hujer KM, Perez F, Hutton RA, Fox WR, Hall GS, Jacobs MR, Paterson DL, Rice LB, Jenkins SG, Tenover FC, Bonomo RA, 2008. «Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. » *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2680-2682.
- Ercoli L, Farneti S, Ranucci D, Scuota S, Branciarri R, 2015. «Role of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the Swine Production Chain.» *Ital J Food Saf* 4 (2).
- Escudero E, Vinue L, Teshager T, Torres C, Moreno MA, 2010. «Resistance mechanisms and farm- level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain.» *Res Vet Sci* 88: 83-87.
- European Antibiotic Resistance Surveillance System (EARS-Net), 2017. «Antibiotic Resistance Surveillance In Europe in 2015.» Report.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2008. *Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* from food animals.* Report, EFSA Journal.

- European Food Safety Authority (EFSA). 2007. «Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers.»
- Evers EG, Pielat A, Smid JH, van Duijkeren E, Vennemann FB, Wijnands LM, Chardon JE, 2017. «Comparative Exposure Assessment of ESBL-Producing *Escherichia coli* through Meat Consumption.» *PLoS One* 12 (1).
- Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL, 2005. «*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies.» *Anim Health Res Rev* 6: 17-39.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE, 2009. «Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms.» *Journal of Hospital Infection* 77: 345-354.
- Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A, Bou G, González-López JJ, Oliver A, Pascual A, Cercenado E, Oteo J, Martínez-Martínez L, Navarro, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI), 2015. «Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain.» *Int J Antimicrob Agents* 46 (2): 157-6.
- Fischer J, Hille K, Ruddat I, Mellmann A, Köck R, Kreienbrock L, 2017. «Simultaneous occurrence of MRSA and ESBL-producing *Enterobacteriaceae* on pig farms and in nasal and stool samples from farmers» *Vet Microbiol* 200: 107-113.
- Fischer J, Rodríguez I, Baumann B, Guiral E, Beutin L, Schroeter A, Kaesbohrer A, Pfeifer Y, Helmuth R, Guerra B, 2014. «bla_{CTX-M-15}-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany.» *J Antimicrob Chemother.* 69 (11): 2951-8.
- Flemming HC, Wingender J, 2010. «The biofilm matrix.» *Nat Rev Microbiol* 8: 6623-633.
- Fleury MA, Mourand G, Jouy E, Touzain F, Le Devendec L, de Boissesson C, Eono F, Cariolet R, Guérin A, Le Goff O, Blanquet-Diot S, Alric M, Kempf I, 2015. «Impact of ceftiofur injection on gut microbiota and *Escherichia coli* resistance in pigs.» *Antimicrob Agents Chemother* 59 (9): 5171-80.
- Frasson I, Cavallaro A, Bergo C, Richter SN, Palù G, 2011. «Prevalence of aac(6)-Ib-cr plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy.» *Gut Pathog.* 3 (12).
- Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM, Feng P, 2016. «Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*.» *Front Microbiol* 7 (644).
- Furtula V, Farrell EG, Diarrassouba F, Rempel H, Pritchard J, Diarra MS, 2010. «Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials.» *Poult Sci* 89: 180-188.
- García-Heredia A, García S, Merino-Mascorro JÁ, Feng P, Heredia N, 2016. «Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.» *Food Microbiol.* 59: 124-32.
- Giaouris E, Heir E, Desvaux M, Hébraud M, Møretro T, Langsrud S, Doulgeraki A, Nychas G-J, Kačaniová M, Czaczyk K, Ölmez H, Simões M, 2015. «Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens.» *Front. Microbiol* 6.

- Gibbons JF, Boland F, Egan J, Fanning S, Markey BK, Leonard FC, 2016. «Antimicrobial Resistance of Faecal *Escherichia coli* Isolates from Pig Farms with Different Durations of In-feed Antimicrobial Use.» *Zoonoses Public Health* 63 (3): 241-50.
- Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Canton R, Walsh TR, 2009. «Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need.» *J Antimicrob Chemother* 63: 1-4.
- Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, Mililli L, Hunt C, Lu J, Osvath SR, Monahan LG, Cavaliere R, Charles IG, Wand MP, Gee ML, Prabhakar R, Whitchurch CB, 2013. «Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA.» *PNAS* (3) 110 (28): 11541-11546.
- Gomes LC, Silva LN, Simões M, Melo LF, Mergulhão FJ, 2015. «*Escherichia coli* adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials.» *J Biomed Mater Res A*. 103 (4): 1414-23.
- Gomes TA, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, Ferreira LC, Martinez MB, 2016. «Diarrheagenic *Escherichia coli*.» *Braz J Microbiol*. 4.
- Goncalves A, Torres C, Silva N, Carneiro C, Radhouani H, Coelho C, Araujo C, Rodrigues J, Vinue L, Somalo S, Poeta P, Igrejas G, 2010. «Genetic Characterization of Extended-Spectrum Beta- Lactamases in *Escherichia coli* Isolates of Pigs from a Portuguese Intensive Swine Farm.» *Foodborne Pathog Dis* 7 (12): 1569-1573.
- Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, Olsen SS, Mordhorst H, Skov RL, Aarestrup FM, Agersø Y, 2014. «Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins.» *J Antimicrob Chemother*. 69 (10): 2650-7.
- Haussler S, Fuqua C, 2013. «Biofilms 2012: New Discoveries and Significant Wrinkles in a Dynamic Field.» *J Bacteriol* 195 (13): 2947–2958.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A, e Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH), 2005. «Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain.» *Antimicrob Agents Chemother* 49 (4): 2122-5.
- Hobbey L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR, 2015. «Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes.» *FEMS Microbiol Rev* 39 (5): 649-69.
- Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A, 2006. «Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates.» *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3203-3206.
- Hughes D, Andersson DI, 2017. «Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance.» *FEMS Microbiol Rev*. 14 (3): 374-391.
- Huguet A, Pensec J, Soumet C, 2013. «Resistance in *Escherichia coli*: variable contribution of efflux pumps with respect to different fluoroquinolones.» *J Appl Microbiol*. 144 (5): 1294-9.
- Hunter PA, Dawson S, French GL, Goossens H, Hawkey PM, Kuijper EJ, Nathwani D, Taylor DJ, Teale CJ, Warren RE, Wilcox MH, Woodford N, Wulf MW, Piddock LJ, 2010. «Antimicrobial- resistant

- pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies.» *J Antimicrob Chemother* 66 (1): 13-17.
- Hwang TJ, Hooper DC, 2014. «Association between fluoroquinolone resistance and resistance to other antimicrobial agents among *Escherichia coli* urinary isolates in the outpatient setting: a national cross-sectional study.» *J Antimicrob Chemother.* 69 (6): 1720-2.
 - Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR, 2015. «A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster.» *DNA Res* 22 (1): 101-107.
 - Jackson CR, Davis JA, Frye JG, Barrett JB, Hiott LM, 2015. «Diversity of Plasmids and Antimicrobial Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Healthy Companion Animals.» *Zoonoses Public Health* 62 (6).
 - Jacoby GA, Munoz-Price LS, 2005. «The New β -Lactamases.» *N Engl J Med* 352 (4): 380-91.
 - Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC, 2015. «Plasmid-mediated quinolone resistance.» *Microbiol Spectr.*
 - Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC, 2006. «qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance.» *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1178- 1182.
 - Jakobsen L, Garneau P, Bruant G, Harel J, Olsen SS, Porsbo LJ, Hammerum AM, Frimodt-Møller N, 2012. «Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31 (6): 1121-1129.
 - Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, Nolan LK, 2007. «Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates.» *Appl Environ Microbiol* 73: 1976-1983.
 - Jorgensen CJ, Cavaco LM, Hasman H, Emborg HD, Guardabassi L, 2007. «Occurrence of CTX-M- 1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur.» *J Antimicrob Chemother* 59: 1040-1042.
 - Kantele A, Lääveri T, Mero S, Vilkinen K, Pakkanen SH, Ollgren J, Antikainen J, Kirveskari J, 2015. «Antimicrobials increase travelers' risk of colonization by extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae*.» *Clin Infect Dis.* 60 (6): 837-46.
 - Kao CY, Lin WH, Tseng CC, Wu AB, Wang MC, Wu JJ, 2014. «The complex interplay among bacterial motility and virulence factors in different *Escherichia coli* infections.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33 (12): 2157-62.
 - Kaufmann F, 1947. «The serology of *E. coli* group.» *J. Immunol* 57: 71-100.
 - Kawamura K, Goto K, Nakane K, Arakawa Y, 2014. «Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan.» *Foodborne Pathog Dis.* 11 (2): 104-10.
 - Kilani H, Abbassi MS, Ferjani S, Mansouri R, Sghaier S, Ben Salem R, Jaouani I, Douja G, Brahim S, Hammami S, Ben Chehida N, Boubaker IB, 2015. «Occurrence of bla CTX-M-1, qnrB1 and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia.» *Front Cell Infect Microbiol.* 5.
 - Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B, 1985. «Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins.» *Antimicrob Agents Chemother* 28 (2): 302-307.

- Lahlaoui H, Khalifa ABH, Moussa MB, 2014. «Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL).» *Médecine et maladies infectieuses* 44: 400-404.
- Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL, 2012. «A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential.» *Public Health Rep* 1 (127): 4-22.
- Lanzas C, Warnick LD, James KL, Wright EM, Wiedmann M, Grohn YT, 2009. «Transmission dynamics of a multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium outbreak in a dairy farm.» *Foodborne Pathog Dis* 7: 467-474.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O, 2013. «Antibiotic resistance—the need for global solutions.» *Lancet Infect Dis* 12 (13): 1057-98.
- Lee M, Shin E, Lee Y, 2014. «Antimicrobial resistance and integron profiles in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs.» *Foodborne Pathog Dis* 11 (12): 988-97.
- LeQuere B, Ghigo JM, 2009. «BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole.» (*Mol Microbiol*) 72: 724–40.
- Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJ, Mevius DJ, 2011. «Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains.» *Clin Microbiol Infect* 17: 873-880.
- Levy SB, FitzGerald GB, Macone AB, 1976. «Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man.» *Nature* 260: 40-42.
- Li J, Ji X, Deng X, Zhou Y, Ni X, Liu X, 2015. «Detection of the SHV genotype polymorphism of the extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacterium.» *Biomed Rep.* 3 (2): 261-265.
- Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D, 2016. «A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous.» *Front Microbiol* 7.
- Liao XP, Xia J, Yang L, Li L, Sun J, Liu YH, Jiang HX, 2015. «Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals.» *Front Microbiol* 6.
- Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, Peixe L, Poirel L, Schuepbach-Regula G, Torneke K, Torren-Edo J, Torres C, Threlfall J, 2013. «Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options.» *Clin Infect Dis* 56 (7): 1030-7.
- Liu W, Yuan C, Meng X, Du Y, Gao R, Tang J, Shi D, 2014. «Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China.» *Vet Journal* 199: 286-9.
- Liu XJ, Lyu Y, Li Y, Xue F, Liu J, 2017. «Trends in Antimicrobial Resistance against *Enterobacteriaceae* Strains Isolated from Blood: A 10-year Epidemiological Study in Mainland China (2004–2014).» *Chin Med J* 130 (17): 2050–2055.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J, 2016. «Emergence of plasmid-mediated

- colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.» *Lancet Infect Dis*. 16 (2): 161-8.
- Livermore DM, 2008. «Defining an extended-spectrum beta-lactamase.» *Clin Microbiol Infect* 14 (1): 3-10.
 - Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N, 2007. «CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. » *J Antimicrob Chemother* 59: 165-174.
 - Lob SH, Nicolle LE, Hoban DJ, Kazmierczak KM, Badal RE, Sahm DF, 2016. «Susceptibility patterns and ESBL rates of *Escherichia coli* from urinary tract infections in Canada and the United States, SMART 2010-2014.» *Diagn Microbiol Infect Dis* 85 (4): 459-465.
 - Madhavan TP, Sakellaris H, 2015. «Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*.» *Adv Appl Microbiol* 90.
 - Maheshwari M, Ahmad I, Althubiani AS, 2016. «Multidrug resistance and transferability of blaCTX-M among extended-spectrum β -lactamase-producing enteric bacteria in biofilm.» *J Glob Antimicrob Resist*. 142-149.
 - Makvana S, Krilov LR, 2015. «*Escherichia coli* Infections.» *Pediatr Rev* 36 (4): 167-70.
 - Manges AR, 2016. «*Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat.» *Clin Microbiol Infect* 22 (2): 122-129.
 - Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG, 2013. «Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. » *BMC Microbiol*.
 - Marti R, Muniesa M, Schmid M, Ahrens CH, Naskova J, Hummerjohann J, 2016. «Short communication: Heat-resistant *Escherichia coli* as potential persistent reservoir of extended-spectrum β -lactamases and Shiga toxin-encoding phages in dairy.» *J Dairy Sci* 99 (11).
 - Marti R, Schmid M, Kulli S, Schneeberger K, Naskova J, Knöchel S, Ahrens CH, Hummerjohann J, 2017. «Biofilm Formation Potential of Heat- Resistant *Escherichia coli* Dairy Isolates and the Complete Genome of Multidrug- Resistant, Heat-Resistant Strain FAM21845.» *Appl Environ Microbiol* .
 - Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD, 2015. «The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*.» *Clin Microbiol Rev* 28 (3): 565-91.
 - Matheus-Guimarães C, Gonçalves EM, Cabilio Guth BE, 2014. «Interactions of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) recovered from bovine hide and carcass with human cells and abiotic surfaces.» *Foodborne Pathog Dis* 11 (3): 248-55.
 - Mattsson S, Wallgren P, 2008. «Phenotyping of *E. coli* serotypes associated to oedema disease.» *Acta Vet Scand* 2.
 - Mazurek J, Bok E, Stosik M, Baldy-Chudzik K, 2015. «Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from pigs during metaphylactic trimethoprim and sulfamethoxazole treatment and in the post-exposure period.» *Int J Environ Res Public Health*. 16 (12): 2150-6.
 - Medina-Polo J, Arrébola-Pajares A, Pérez-Cadavid S, Benítez-Sala R, Sopeña-Sutil R, Lara-Isla A, Alonso-Isa M, Gil-Moradillo J, Justo-Quintas J, Miranda-Utrera N, Aguilar-Gisbert L, Passas-Martínez

- JB, Tejido-Sánchez Á, 2015. «Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in a Urology Ward: Epidemiology, Risk Factors and Antimicrobial Susceptibility Patterns.» *Urol Int* 95 (3): 288-292.
- Michael GB, Kaspar H, Siqueira AK, de Freitas Costa E, Corbellini LG, Kadlec K, Schwarz S, 2017. «Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008-2014.» *Vet Microbiol.* 200: 142-150.
 - Mollenkopf DF, Cenera JK, Bryant EM, King CA, Kashoma I, Kumar A, Funk JA, Rajashekara G, Wittum TE, 2014. «Organic or antibiotic-free labeling does not impact the recovery of enteric pathogens and antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from fresh retail chicken.» *Foodborne Pathog Dis* 11 (12): 920-929.
 - Ministero della Salute, 2016. «Decreto n. 117, revoca delle autorizzazioni all'immissione in commercio di tutti i medicinali per uso veterinario contenenti «colistina» in associazione con altri agenti antimicrobici per somministrazione orale» 25 Luglio 2016.
 - Moodley A, Guardabassi L, 2009. «Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers.» *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 1709- 1711.
 - Moremi N, Claus H, Vogel U, Mshana SE, 2017. «Faecal carriage of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among street children dwelling in Mwanza city, Tanzania.» *PLoS One* 12 (9).
 - Mukerji S, O'Dea M, Barton M, Kirkwood R, Lee T, Abraham S, 2017. «Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact.» *Essays Biochem* 61 (1): 23-35.
 - Mulki SS, Ramamurthy K, Bhat S, 2017. «Fecal Carriage of Extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Intensive Care Unit Patients.» *Indian J Crit Care Med* 21 (8): 525–527.
 - Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE, 2012. «Enhanced Biofilm Formation by *Escherichia coli* LPS Mutants Defective in Hep Biosynthesis.» *PLoS One* 7 (12).
 - Nesse LL, Sekse C, Berg K, Johannesen KCS, Solheim H, Vestby LK, Urdahl AM, 2014. «Potentially pathogenic *E. coli* can produce biofilm under conditions relevant for the food production chain.» *Appl Environ Microbiol.* 80 (7): 2042–2049.
 - Nordmann P, Cuzon G, Naas T, 2009. «The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.» *Lancet Infect Dis* 9: 228-236.
 - Oduro-Mensah D, Obeng-Nkrumah N, Bonney EY, Oduro-Mensah E, Twum-Danso K, Osei YD, Sackey ST, 2016. «Genetic characterization of TEM-type ESBL-associated antibacterial resistance in *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Ghana.» *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* .
 - Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI, Leiva J, García-Jalón I, Febles-Casquero A, Escolano Mde L, 2013. «Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain.» *Meat Sci.* 93 (2): 316-21.
 - Paterson DL, Bonomo RA, 2005. «Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.» *Clin Microbiol Rev* 18 (4): 657-86.

- Peirano G, Costello M, Pitout JD, 2010. «Molecular characteristics of extended-spectrum beta- lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. » *Int J Antimicrob Agents* 36: 19-23.
- Pereira AL, Silva TN, Gomes AC, Araújo AC, Giugliano LG, 2010. «Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili.» *BMC Microbiol.*
- Persoons D, Haesebrouck F, Smet A, Herman L, Heyndrickx M, Martel A, Catry B, Berge AC, Butaye P, Dewulf J, 2010. «Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers.» *Epidemiol Infect* 139: 765-771.
- Peymani A, Farivar TN, Sanikhani R, Javadi A, Najafipour R, 2014. «Emergence of TEM, SHV, and CTX-M-extended spectrum β -lactamases and class 1 integron among *Enterobacter cloacae* isolates collected from hospitals of Tehran and Qazvin, Iran.» *Microb Drug Resist.* 20 (5): 424-30.
- Pimenta AC, Fernandes R, Moreira IS, 2014. «Evolution of drug resistance: insight on TEM β -lactamases structure and activity and β -lactam antibiotics.» *Mini Rev Med Chem.* 14 (2): 111-22.
- Pitout JD and Laupland KB, 2008. «Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern.» *Lancet Infect Dis* 8: 159-166.
- Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Bruderer T, Frei R, Nordmann P, 2010. «A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*.» *J Antimicrob Chemother* 65: 1594-1598.
- Poolman JT, 2017. «*Escherichia coli*.» In *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, di Davidson HH, Glanz K, Killewo J, Rosamond W, Mayer JD, Cockerham WC, Sharma VK, Heggenhougen K Quah SR, a cura di Quah SR, 585–593. Academic Press.
- Projahn M, Daehre K, Roesler U, Friese A, 2016. «Extended-Spectrum-Beta-Lactamase and Plasmid-Encoded Cephamycinase-Producing *Enterobacteria* in the Broiler Hatchery as a Potential Mode of Pseudo-Vertical Transmission.» *Appl Environ Microbiol.* 83 (1).
- Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ, 2011. «Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009.» *J Antimicrob Chemother* 66: 86-95.
- Randall LP, Lodge MP, Elviss NC, Lemma FL, Hopkins KL, Teale CJ, Woodford N, 2017. «Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*.» *Int J Food Microbiol.* 283-290.
- Ranjan A, Shaik S, Nandanwar N, Hussain A, Tiwari SK, Semmler T, Jadhav S, Wieler LH, Alam M, Colwell RR, Ahmed N, 2017. «Comparative Genomics of *Escherichia coli* Isolated from Skin and Soft Tissue and Other Extraintestinal Infections.» *mBio.* 8 (4).
- Ranjith K, Arunasri K, Reddy GS, Adicherla H, Sharma S, Shivaji S. 2017. «Global gene expression in *Escherichia coli*, isolated from the diseased ocular surface of the human eye with a potential to form biofilm.» *Gut Pathog.*
- Rasheed MU, Thajuddin N, Ahamed P, Teklemariam Z, Jamil K, 2014. «Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources.» *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56 (4): 341-6.

- Rayamajhi N, Kang SG, Lee DY, Kang ML, Lee SI, Park KY, Lee HS, Yoo HS, 2008. «Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type beta-lactamases from cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from swine.» *Int J Food Microbiol* 124: 183-187.
- Reuland EA, Sonder GJ, Stolte I, Al Naiemi N, Koek A, Linde GB, van de Laar TJ, Vandenbroucke-Grauls CM, van Dam AP, 2016. «Travel to Asia and traveller's diarrhoea with antibiotic treatment are independent risk factors for acquiring ciprofloxacin-resistant and extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*-a prospective cohort study.» *Clin Microbiol Infect* 22 (8): 1-7.
- Reynaga E, Navarro M, Vilamala A, Roure P, Quintana M, Garcia-Nuñez M, Figueras R, Torres C, Lucchetti G, Sabrià M, 2016. «Prevalence of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs and pig farm workers in an area of Catalonia, Spain.» *BMC Infect Dis.* 28 (16).
- Robin F, Delmas J, Machado E, Bouchon B, Peixe L, Bonnet R. 2011. «Characterization of the Novel CMT Enzyme TEM-154.» *Antimicrob Agents Chemother.* 55 (3): 1262-5.
- Rodrigues C, Machado E, Peixe L, Novais A, 2013. «IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries.» *J Antimicrob Chemother.* 68 (10): 2245-8.
- Rodrigues, C., Machado, E., Ramos, H., Peixe, L., and Novais, A., 2014. «Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK).» *Int. J. Antimicrob. Agents* 304: 1100–1108.
- Rodriguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tortola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Pena C, Llanos AC, Canton R, Pascual A, 2008. «Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*.» *Arch Intern Med* 168: 1897-1902.
- Rosa R, Abbo LM, Raney K, Tookes HE, Supino M, 2007. «Antimicrobial resistance in urinary tract infections at a large urban ED: Factors contributing to empiric treatment failure.» *Am J Emerg Med.* 35 (3): 397-401.
- Rubtsova MY, Ulyashova MM, Bachmann TT, Schmid RD, Egorov AM, 2010. «Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases.» *Biochemistry (Mosc)* 75 (13): 1628-1649.
- Ruppé É, Woerther PL, Barbier F, 2015. «Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli.» *Ann Intensive Care* 5 (21).
- Sarkar S, Ulett GC, Totsika M, Phan MD, Schembri MA. 2014. «Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*.» *PLoS One* 9 (4).
- Sarkar S, Ulett GC, Totsika M, Phan MD, Schembri MA, 2014. «Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*.» *PLoS ONE* 9 (4).
- Schwaber MJ, Carmeli Y, 2007. «Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. » *J Antimicrob Chemother* 60: 913-920.
- Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A, 2013. «Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health?» *Drug Resist Updat* 16 (1-2): 22-45.

- Serra DO, Hengge R, 2014. «Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms.» *Environ Microbiol* 16 (6): 1455-71.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA, 2015. «Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment.» *Saudi J Biol Sci.* 22 (1): 90–101.
- Sharma VK, Kudva IT, Bearson BL, Stasko JA, 2016. «Contributions of EspA Filaments and Curli Fimbriae in Cellular Adherence and Biofilm Formation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7» *PLoS One* 11.
- Sherlock O, Schembri MA, Reisner A, Klemm P, 2004. «Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation.» *J Bacteriol* 186: 8058–65.
- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2008. «Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health.» *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1238-1243.
- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P, 2010. «Broad-spectrum b-lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health.» *FEMS Microbiol Rev* 34 (3): 295-316.
- Smith R, Coast J, 2013. «The true cost of antimicrobial resistance.» *BMJ*.
- Song W, Kim YH, Sim SH, Hwang S, Lee JH, Lee Y, Bae J, Hwang J, Lee K, 2014. «Antibiotic stress-induced modulation of the endoribonucleolytic activity of RNase III and RNase G confers resistance to aminoglycoside antibiotics in *Escherichia coli*.» *Nucleic Acids Res* 42 (7).
- Stacy AK, Mitchell NM, Maddux JT, De la Cruz MA, Durán L, Girón JA, Curtiss R 3rd, Mellata M, 2014. «Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence.» *PLoS One* 9 (1).
- Steenackers HP, Parijs I, Foster KR, Vanderleyden J, 2016. «Experimental evolution in biofilm populations.» *FEMS Microbiol Rev.* 40 (3): 373-97.
- Stefani S, Giovanelli I, Anacarso I, Condò C, Messi P, de Niederhäusern S, Bondi M, Iseppi R, Sabia C, 2014. «Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in food-producing animals in Northern Italy.» *New Microbiol* 37 (4): 551-5.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F, 2007. «Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.» *APMIS* 115 (8): 891-9.
- Sunde M, Simonsen GS, Slettemeås JS, Böckerman I, Norström M, 2015. «Integron, Plasmid and Host Strain Characteristics of *Escherichia coli* from Humans and Food Included in the Norwegian Antimicrobial Resistance Monitoring Programs.» *PLoS One* 10 (6).
- Törneke K, Torren-Edo J, Grave K, Mackay DK, 2015. «The management of risk arising from the use of antimicrobial agents in veterinary medicine in EU/EEA countries – a review.» *J Vet Pharmacol Ther.* 38 (6): 519-28.
- Tal J R, Coyle JR, Katz DE, Marchaim D, 2015. «The complex epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*.» *Future Microbiol* 10 (5): 819-39.

- Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY, 2014. «Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria.» *Adv Drug Deliv Rev* 78: 3-13.
- Tellevik MG, Blomberg b, Kommedal Ø, Maselle SY, Langeland N, Moyo SJ, 2016. «High Prevalence of Faecal Carriage of ESBL-Producing *Enterobacteriaceae* among Children in Dar es Salaam, Tanzania.» *PlosOne* (PlosOne) 11(12).
- Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME, 2017. «UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies.» *Front Microbiol.* 8: 1-23.
- Tóth A, Juhász-Kaszanyitzky É, Mag T, Hajbel-Vékony G, Pászti J, Damjanova I, 2013. «Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* strains isolated from animal and human clinical samples in Hungary in 2006-2007.» *Acta Microbiol Immunol Hung* 60 (2): 175-85.
- Valentin L, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y, Michael GB, Nickel S, Schmiedel J, Falgenhauer L, Friese A, Bauerfeind R, Roesler U, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Helmuth R, Valenza G, Werner G, Schwarz S, Guerra B, Appel B, Kreienbrock L, Käsbohrer A, 2014. «Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs.» *Int J Med Microbiol* 304 (7): 805-16.
- Valverde A, Canton R, Garcillan-Barcia MP, Novais A, Galan JC, Alvarado A, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM, 2009. «Spread of blaCTX-M-14 is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain.» *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5204-5212.
- Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R, 2004. «Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain.» *J Clin Microbiol* 42: 4769-4775.
- van Cleef BA, van Benthem BH, Verkade EJ, van Rijen M, Kluytmans-van den Bergh MF, Schouls LM, Duim B, Wagenaar JA, Graveland H, Bos ME, Heederik D, Kluytmans JA, 2014. «Dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* carriage in pig farmers: a prospective cohort study.» *Clin Microbiol Infect.* 20 (10).
- Van Meervenne E, De Weirdt R, Van Coillie E, Devlieghere F, Herman L, Boon N. 2014. «Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer?» *Pathog Dis.* 70 (3): 332-8.
- Vijay D, Dhaka P, Vergis J, Negi M, Mohan V, Kumar M, Doijad S, Poharkar K, Kumar A, Malik SS, Barbuddhe SB, Rawool DB, 2015. «Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals.» *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 38: 21-31.
- Visschers VH, Backhans A, Collineau L, Iten D, Loesken S, Postma M, Belloc C, Dewulf J, Emanuelson U, Beilage EG, Siegrist M, Sjölund M, Stärk KD, 2015. «Perceptions of antimicrobial usage, antimicrobial resistance and policy measures to reduce antimicrobial usage in convenient samples of Belgian, French, German, Swedish and Swiss pig farmers.» *Prev Vet Med.* 119 (1-2): 10-20.
- Visschers VH, Backhans A, Collineau L, Loesken S, Nielsen EO, Postma M, Belloc C, Dewulf J, Emanuelson U, Grosse Beilage E, Siegrist M, Sjölund M, Stärk KD, 2016. «A Comparison of Pig Farmers'

- and Veterinarians' Perceptions and Intentions to Reduce Antimicrobial Usage in Six European Countries.» *Zoonoses Public Health* 63 (7): 534-544.
- Vogeeler P, Tremblay YD, Mafu AA, Jacques M, Harel J, 2014. «Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*.» *Front Microbiol*.
 - Walsh TR, 2008. «Clinically significant carbapenemases: an update.» *Curr Opin Infect Dis* 21: 367-371.
 - Wang J, Ma ZB, Zeng ZL, Yang XW, Huang Y, Liu JH, 2017. «The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes.» *Zool Res* 38 (2): 55- 80.
 - Wang XM, Liao XP, Liu SG, Zhang WJ, Jiang HX, Zhang MJ, Zhu HQ, Sun Y, Sun J, Li AX, Liu YH. 2011. «Serotypes, virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from pigs.» *Foodborne Pathog Dis* 8 (6): 687-92.
 - Waters D, Jawad I, Ahmad A, Lukšić I, Nair H, Zgaga L, Theodoratou E, Rudan I, Zaidi AK, Campbell H, 2011. «Aetiology of community-acquired neonatal sepsis in low and middle income countries.» *J Glob Health* 1 (1): 154-70.
 - Wener KM, Schechner V, Gold HS, Wright SB, Carmeli Y, 2010. «Treatment with fluoroquinolones or with beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations is a risk factor for isolation of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella* species in hospitalized patients.» *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2010-2016.
 - Wieczorek K, Osek J, 2013. «Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*.» *Biomed Res Int*.
 - Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, Weinstein RA, 1999. «Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes.» *JAMA* 6: 517-23.
 - Wijetunge DS, Gongati S, DebRoy C, Kim KS, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Kariyawasam S. 2015. «Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC).» *BMC Microbiol* 15.
 - Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A, 2013. «Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M.» *Clinical Microbiology Rev* 26 (4): 744-758.
 - World Health Organisation, 2017. «Critically Important Antimicrobials for Human Medicine- 5^o revision (2016).»
 - World Health Organisation, 2014. «Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance.» Report.
 - Wu Z, Xia R, Yin X, Huo Y, Zhu G, Wu S, Bao W. 2015. «Proteomic Analysis of Duodenal Tissue from *Escherichia coli* F18-Resistant and -Susceptible Weaned Piglets.» *PLoS One* 10 (6).
 - Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016. «Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016.» *Euro Surveill.* 21 (27).
 - Ørskov F, Ørskov I. 1984. «Serotyping of *Escherichia coli*.» *Methods in Microbiology* 14: 43-112.
 - Ørskov I, Ørskov F, Jann B, Jann K. 1977. «Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*.» *Bacteriol. Rev.* 41: 667-710.

- Zahar JR, Lortholary O, Martin C, Potel G, Plesiat P, Nordmann P, 2009. «Addressing the challenge of extended-spectrum beta-lactamases.» *Curr Opin Investig Drugs* 10: 172-180.
- Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, Chrysos G, Prekates A, Voutsinas D, Themeli-Digalaki K, Tsakris A, 2010. «Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC- producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study. .» *J Clin Microbiol* 48: 2271-2274.
- Zhang C, Xu X, Pu S, Huang S, Sun J, Yang S, Zhang L, 2014. «Characterization of carbapenemases, extended spectrum β -lactamases, quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants in carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* from a teaching hospital in Chongqing, Southwest China.» *Infect Genet Evol* 27.
- Zhou G, Shi QS, Huang XM, Xie XB, 2015. «The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents.» *Int J Mol Sci.* 16 (9).
- Zhou M, Guo Z, Duan Q, Hardwidge PR, Zhu G, 2014. «*Escherichia coli* type III secretion system 2: a new kind of T3SS?» *Vet Res* 19.