

Valutazione del livello di antimicrobico-resistenza in due aziende di vacche da latte a diverso consumo di antimicrobici



BENEDETTA CORDIOLI^{1*}, CARMEN LOSASSO², MASSIMILIANO ORSINI², ALESSIA RIZZARDI¹, ANGELA GUOLO¹, LUCA PALAZZOLO¹, MANUEL GARBUIO¹, CECILIA TOLASI³, DAVIDE BIZZARRI⁴, LUCA BANO¹

¹ Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie, Laboratorio di batteriologia speciale, sezione di Treviso

² Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie, Laboratorio di ecologia microbica e genomica dei microrganismi

³ Medico Veterinario Libero professionista

⁴ Medico Veterinario, Fatro S.p.A.

SUMMARY

Antimicrobial resistance is a natural phenomenon resulting from the exposure to the active ingredients. Antibiotic consumption in veterinary medicine is strictly ruled and farms are classified on the basis of the veterinary medical prescriptions. The aim of the present study was to assess the antimicrobial resistance level in two dairy herds using different quantities of antimicrobials.

Faeces from all the animal categories of dairy farms, milk and colostrum underwent bacteriological examinations in order to isolate bacterial species considered indicators of antimicrobial resistance (*Escherichia coli* and *Enterococcus* sp) and metagenomics to analyse circulating antimicrobial resistance genes (ARG) and their relative abundance. The susceptibility of *E. coli* and *Enterococcus* sp strains against a panel of antimicrobials was tested through the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The presence of ARGs was detected in pooled samples through NGS shot-gun sequencing and some selected ARGs were subsequently quantified by means of the digital PCR method.

All the *E. coli* strains tested were susceptible to critical important antimicrobials (CIA) and resistant to sulphonamides. The highest MIC values of aminoglycosides, fluoroquinolones and amphenicols and most of the multidrug-resistant (MDR) *E. coli* strains were isolated from calves and colostrum. All *Enterococcus* sp strains were susceptible to betalactams, linezolid, teicoplanin and, most importantly, vancomycin. All the isolates were resistant to tigecycline and gentamicin, while 11/20 strains were resistant to erythromycin. All *Enterococcus* sp strains isolated from calves were resistant to streptomycin. The ARGs quantitatively more relevant in the farms were *ermB*, *sul2* and *blaTEM*, conferring macrolides-lincosamine-streptogramin B resistance, sulphonamides-resistance and betalactams resistance respectively. Genes not detected in either farms were: *blaCTXM*, *qnrS*, *mcr-1* and *VanA*. Although the differences in the antimicrobial consumption the results do not show relevant differences between farms, since the antimicrobial resistance indexes (ARI) were comparable. Dairy farms could be considered a hotspot of ARGs, comprising those classified as the highest risk for human health (*ermB* and *blaTEM*). Furthermore, this study identified the role of calves as the main source of ARGs and “non-wild” bacterial strains in dairy farms. Also, the presence of MDR *E. coli* in colostrum could represent a risk for early intestinal colonization and subsequent dissemination of resistant strains.

KEY WORDS

Antimicrobial resistance; dairy cows; MIC; NGS.

INTRODUZIONE

La zootecnia moderna sta vivendo delle sfide importanti in materia di etica delle produzioni, sostenibilità economica e impatto ambientale. Queste tre dimensioni sono intimamente interconnesse al punto che una non può prescindere dall'altra. In tema di etica delle produzioni, l'impiego di antimicrobici negli allevamenti è percepito dal consumatore con preoccupazione, non solo perché questo presuppone scadenti livelli di benessere animale a cui è sempre più sensibile, ma anche in relazione al noto problema delle antibioticoresistenze.

Questo ha portato a sistemi di classificazione delle aziende che tengano conto, tra l'altro, del livello di consumo di antimicrobico, inteso come fattore di rischio per l'insorgenza di popolazioni microbiche antibioticoresistenti. Il consumo viene misurato in defined daily dose (DDD), unità di misura standard della prescrizione farmaceutica, definita dall'Organizzazione mondiale della sanità come la «dose di mantenimento giornaliera media di un farmaco utilizzato per la sua indicazione principale» [1]. Negli allevamenti bovini italiani questo parametro viene calcolato nel sistema Classyfarm come il rap-

Corresponding Author:
Benedetta Cordioli (bcordioli@izsvnezie.it)

porto tra il consumo di antibiotici (ricavato automaticamente dalle ricette elettroniche prescritte) e la consistenza media annua dei capi (ricavato automaticamente dalla Banca Dati Nazionale).

Con il presente studio si è voluto indagare il livello di antimicrobico-resistenza in due allevamenti di bovine da latte, in relazione al differente consumo di antibiotico.

MATERIALI E METODI

Selezione degli allevamenti

I due allevamenti (“1” e “2”) campionati sono situati in provincia di Brescia (BS)-Italy con minime differenze in termini di numerosità di capi e sono stati selezionati dal veterinario aziendale sulla base del consumo di antimicrobico in DDD (tabella 1). Entrambi gli allevamenti ospitano bovine di razza Frisone Italiana con produzione latte media giornaliera per capo pari rispettivamente a 37 e 32 kg. Entrambe le aziende hanno rimonta solo interna e le stalle sono a stabulazione libera con area di riposo a cuccette. Durante i mesi invernali si osservano le principali problematiche sanitarie rappresentate da enteriti neonatali e da problematiche ginecologiche (ritenzioni placentari e metriti). Per entrambi gli allevamenti il consumo di antimicrobico risulta inferiore alla media nazionale per il periodo considerato (2° semestre 2021), sebbene l'allevamento “2” abbia un valore in DDD pari al triplo dell'allevamento “1”. I principi attivi ad azione antimicrobica prescritti in ciascun allevamento nel corso del 2021 sono riportati in tabella 2.

Campionamento

In Aprile 2022 i due allevamenti sono stati campionati dal veterinario aziendale prelevando le matrici descritte in Tabella 3.

La numerosità campionaria è stata stabilita sulla base di quanto già applicato in studi simili, presenti in letteratura [3]. Le feci provenienti dall'Allevamento 1 sono state aggregate in pool per categoria produttiva e congelate prima del conferimento al laboratorio, mentre quelle dell'allevamento 2 sono state conferite in aliquote individuali. I campioni di latte di massa e di colostro sono stati trasportati al laboratorio in contenitori sterili in condizioni di refrigerazione.

ANALISI DI LABORATORIO

Valutazione fenotipica dell'antimicrobico-resistenza

Da tutte le matrici è stato eseguito un esame batteriologico colturale al fine di isolare almeno 1 ceppo di *Enterococcus* spp ed *Escherichia coli* (*E. coli*), ritenuti indicatori del fenomeno [2]. L'isolamento è avvenuto su terreni colturali non selettivi. Dalle matrici fecali dell'allevamento 1 conferite aggregate per categoria produttiva, sono stati eseguiti accertamenti batteriologici da pun-

Tabella 1 - Numerosità di animali e consumo di farmaco in DDD totali e suddiviso per categoria animale. I dati si riferiscono al secondo semestre del 2021.

| | Allevamento 1 | | Allevamento 2 | |
|----------------|---------------|------------|---------------|------------|
| | DDD | N. animali | DDD | N. animali |
| Totale | 0,6 | 430 | 1,85 | 421 |
| Vacche | 0,56 | 220 | 2,9 | 220 |
| Vitelli | 20,32 | 35 | 56,26 | 25 |
| Manze | 0,1 | 175 | 0 | 176 |

Tabella 2 - Principi attivi prescritti negli allevamenti oggetto di studio.

| Allevamento | Principi attivi prescritti |
|-------------|--|
| 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Aminosidina/paromomicina solfato • Cefazolina • Florfenicolo • Cloxacillina • Amoxicillina e acido clavulanico • Sulfamonometossina ed eritromicina |
| 2 | <ul style="list-style-type: none"> • Aminosidina/paromomicina solfato • Cefazolina • Ampicillina • Rifaximina • Florfenicolo • Amoxicillina e acido clavulanico • Trimetoprim e sulfametazina • Sulfamonometossina ed eritromicina |

ti diversi del pool, al fine di ottenere più ceppi da sottoporre alla valutazione fenotipica delle resistenze. Il profilo di antimicrobico-resistenza (AMR) degli isolati è stato valutato attraverso il test della determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), individuata mediante il metodo della micro-diluzione in brodo utilizzando piastre commerciali (Sensititre EU Surveillance Plates YEUVSEC3 e CMV3AGPF) allestite con principi attivi d'interesse prevalentemente umano. Il numero di ceppi isolati e sottoposti al test sono riportati nelle tabelle 4 e 5. Da ciascuna matrice risultata positiva all'isolamento per *E. coli*, è stato sottoposto al test 1 solo ceppo. Nel caso di *Enterococcus*, la specie d'elezione era rappresentata da *E. faecalis*, ma in assenza di un numero sufficiente di isolati (almeno 10), sono stati testati ceppi di *E. faecium*.

I risultati di MIC sono stati interpretati applicando i cut-off epidemiologici (ecoff) presenti nel documento EFSA (2019), che permettono di distinguere gli isolati come “non-wild” o “wild”, a seconda che rispettivamente siano o non siano presumibilmente entrati in contatto con il principio attivo testato [2]. Sono stati classificati come multiresistenti (MDR) tutti i ceppi con valori di MIC superiori all'ecoff per almeno 3 principi attivi appartenenti a 3 diverse classi antimicrobiche. Successivamente è stato calcolato l'*antimicrobial resistance index* (ARI), che indica la probabilità che un isolato risulti “non-wild” nei confronti di uno dei principi attivi in analisi [4].

Tabella 3 - Numerosità per ogni allevamento e categoria animale di appartenenza delle matrici campionate.

| | Vacche in lattazione (VL) | Vacche in asciutta (VA) | Manze (M) | Vitelli (VIT) |
|----------------|---------------------------|-------------------------|-----------|---------------|
| Feci | 20 | 7 | 7 | 5 |
| Latte di massa | 1 | / | / | / |
| Colostro (CL) | 5 | / | / | / |

Tabella 4 - Origine e categoria produttiva dei ceppi di *E. coli* inclusi nello studio.

| Categoria animale | N. ceppi | |
|-------------------|----------|----------|
| | Allev. 1 | Allev. 2 |
| VL | 5 | 6 |
| VA | 5 | 5 |
| M | 4 | 4 |
| VIT | 5 | 4 |
| CL | 1 | 1 |

Tabella 5 - Origine e categoria produttiva dei ceppi di *Enterococcus* sp inclusi nello studio.

| Categoria animale | n. ceppi | | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | Allev. 1 | | Allev. 2 |
| | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecium</i> | <i>E. faecalis</i> |
| VL | 1 | 2 | 4 |
| VA | / | 1 | 1 |
| M | / | 2 | 1 |
| VIT | 4 | / | 4 |

Valutazione genotipica dell'antimicrobicoresistenza

Oltre ai test fenotipici sono stati applicati anche dei test genotipici. Questi ultimi sfruttano le nuove tecnologie di sequenziamento NGS per identificare i geni di antibiotico resistenza (resistoma) presenti nel genoma della comunità microbica residente (metagenoma) in campioni biologici e matrici ambientali. Nel caso di questo studio, da tutte le matrici campionate è stato estratto il DNA totale, successivamente sottoposto a sequenziamento NGS con metodica shot-gun e analizzato dal punto di vista bioinformatico per ottenere il Resistoma. Alcuni geni di antibiotico-resistenza, di particolare interesse per la salute pubblica, sono stati successivamente sottoposti a quantificazione per ottenere la percentuale di batteri della comunità microbica che presentavano i geni di antibiotico resistenza oggetto dell'analisi. I geni ricercati hanno compreso alcuni tra quelli che codificano resistenze nei confronti delle tetracicline (*tetA*), sulfamidici (*sul2*), macrolidi-lincosamidi-streptogramina B (*ermB*), chinolonici (*qnr*), cefalosporine a spettro esteso (*bla*TEM e *bla*CTX), colistina (*mcr-1*) e vancomicina (*vanA*).

Tabella 6 - Distribuzione dei ceppi di *E. coli* rispetto alle diverse concentrazioni di principio attivo testato e valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ (%).

| Antimicrobico | Allev. | <0.015 | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|-------------------|--------|--------|-------|------|------|-------|------|-----|----|----|----|---|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|-------------------|-------------------|
| Amikacina | 1 | | | | | | | | 18 | 1 | | 1 | | | | | | | | | <4 | <4 |
| | 2 | | | | | | | | 19 | 1 | | | | | | | | | | | | <4 |
| Ampicillina | 1 | | | | | | | | 7 | 9 | 1 | | | 1 | 2 | | | | | | 4 | 4 |
| | 2 | | | | | | | | 11 | 5 | 1 | | | | 3 | | | | | | 2 | 4 |
| Azitromicina | 1 | | | | | | | | | 5 | 14 | | | | 1 | | | | | | 8 | 8 |
| | 2 | | | | | | | | 1 | 7 | 11 | 1 | | | | | | | | | 8 | 8 |
| Cefotaxime | 1 | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | | | | <0,25 | <0,25 |
| | 2 | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | | | | <0,25 | <0,25 |
| Ceftazidime | 1 | | | | | 19 | | 1 | | | | | | | | | | | | | <0,25 | <0,25 |
| | 2 | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | | | | <0,25 | <0,25 |
| Cloramfenicolo | 1 | | | | | | | | | 19 | | | 1 | | | | | | | | <8 | <8 |
| | 2 | | | | | | | | | 17 | | | 1 | | 2 | | | | | | <8 | 16 |
| Ciprofloxacina | 1 | 15 | | 2 | 1 | | | | | | | | 2 | | | | | | | | <0,015 | 0,06 |
| | 2 | 18 | | 1 | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | <0,015 | <0,015 |
| Colistina | 1 | | | | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | <1 | <1 |
| | 2 | | | | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | <1 | <1 |
| Gentamicina | 1 | | | | | | 15 | | 5 | | | | | | | | | | | | <0,5 | 1 |
| | 2 | | | | | | | 15 | 3 | | | | 1 | 1 | | | | | | | 0,5 | 1 |
| Meropenem | 1 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | <0,03 | <0,03 |
| | 2 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | <0,03 | <0,03 |
| Acido Nalidissico | 1 | | | | | | | | 17 | | | 1 | | | | 2 | | | | | <4 | 8 |
| | 2 | | | | | | | | 19 | | | | | | | 1 | | | | | <4 | <4 |
| Sulfametossazolo | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 4 | 16 | | >512 | >512 |
| | 2 | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 1 | | 1 | 3 | 12 | | | >512 | >512 |
| Tetraciclina | 1 | | | | | | | | 18 | | | | | | 2 | | | | | | <2 | <2 |
| | 2 | | | | | | | | 18 | | | | | | 2 | | | | | | <2 | <2 |
| Tigeciclina | 1 | | | | | 19 | | 1 | | | | | | | | | | | | | <0,25 | <0,25 |
| | 2 | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | | | | <0,25 | <0,25 |
| Trimetoprim | 1 | | | | | 7 | | 10 | 2 | | | | | 1 | | | | | | | 0,5 | 1 |
| | 2 | | | | | 8 | | 8 | 2 | | | | | 2 | | | | | | | 0,5 | 1 |

Note. Le caselle bianche corrispondono alle concentrazioni di antimicrobico che sono state testate secondo le linee guida. Le linee verticali sono indicative dei cut-off epidemiologici [2].

Tabella 7 - Distribuzione dei ceppi di *Enterococcus spp* rispetto alle diverse concentrazioni di principio attivo testato e valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ (%).

| Antimicrobico | Allev. | <0.015 | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | |
|----------------------------|--------------------|--------|-------|------|------|-------|------|-----|---|---|---|---|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|-------------------|-------------------|------|
| Ampicillina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | 1 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | 2 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | | | 0,5 | 0,5 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | 1 | | | | | | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Cloramfenicolo | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | | | | 4 | | | 1 | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | | | | 6 | | | 4 | | | | | | | 8 | 64 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | |
| Ciprofloxacina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | 1 | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | 4 | 4 | 1 | 1 | | | | | | | | | | 2 | 4 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | | | 1 | 1 | 3 | | | | | | | | | | | |
| Daptomicina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | 1 | | 1 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | | | | | | | | | | 2 | 4 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | 1 | | | | | 4 | | | | | | | | | | | | |
| Eritromicina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | 1 | 1 | 3 | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | | | | | | | 4 | 8 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | 1 | | | 1 | 3 | | | | | | | | | | | |
| Linezolid | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | 2 | 2 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | | | 3 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| Nitrofurantoin | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | | | 3 | 2 | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | | | 2 | 8 | | | | | | | | | | 16 | 16 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | | | | | 1 | | | 4 | | | | | | | | |
| Gentamicina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | | | | | | | | 10 | | | | | | 128 | 128 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | |
| Penicillina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | 0 | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | 2 | 8 | | | | | | | | | | | | 2 | 2 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | | | | 4 | | | 1 | | | | | | | | | |
| Quinuoprostin/dalfopristin | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | 1 | 1 | 3 | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | 1 | 6 | 3 | | | | | | | | | | | 8 | 16 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | 1 | | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Streptomicina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | | | | | | | | 2 | | | | | 3 | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | | | | | | | | | 8 | | | | | 2 | <512 | 2048 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | | | | | | | | 1 | 4 | | | | | | | |
| Teicoplanina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | 1 | | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | 2 | 4 | 4 | | | | | | | | | | | | | | 0,25 | 0,5 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | 1 | | | | | | 4 | | | | | | | | | | | | | | |
| Tetraciclina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | 2 | | | | | | | 3 | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | 4 | | | | | | 1 | 5 | | | | | | | 32 | >32 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tigeciclina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | 4 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | 5 | 5 | | | | | | | | | | | | | 0,5 | >0,5 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | 1 | | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vancomicina | <i>E. faecalis</i> | 1 | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E. faecalis</i> | 2 | | | | | | 1 | 3 | 6 | | | | | | | | | | | | 2 | 2 |
| | <i>E. faecium</i> | 1 | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | |

Note. Le caselle bianche corrispondono a concentrazioni di antimicrobico che sono state testate secondo le linee guida. Le linee verticali sono indicative dei cut-off epidemiologici [2].

RISULTATI

I valori percentuali dei ceppi con resistenze nei confronti dei principi attivi testati sono riportati nelle figure 1-3. Da tutte le matrici è stato isolato *E. coli*. Nell'allevamento 2 è stato possibile ottenere i 10 ceppi di *E. faecalis* previsti, mentre dall'allevamento 1 sono stati isolati 5 ceppi di *E. faecalis* e 5 di *E. fae-*

cium. Da colostro e latte di massa è stato possibile isolare almeno 1 ceppo di *E. coli*.

La descrizione del resistoma dei campioni oggetto di indagine è riportata in Tabella 9.

In tabella 10 sono riportati i risultati relativi alle prove di identificazione e quantificazione di un pannello di geni di resistenza identificati a partire dallo studio del resistoma.

DISCUSSIONE

Al fine della corretta interpretazione dei risultati è necessario sottolineare che i due allevamenti oggetti di studio, nonostante le differenze in termini di consumo di antimicrobico, si collocano al di sotto della media nazionale del secondo semestre del 2021 pari a 4,14 DDD.

Inoltre, nella lettura dei risultati fenotipici, è necessario tenere conto dalla diversa modalità di campionamento. In particolare si ricorda che i campioni di feci prelevati nell'allevamento 1 sono stati aggregati e congelati prima del conferimento e non è possibile escludere che siano stati testati più ceppi di uno stesso soggetto con possibili errori di overclustering. Tuttavia, il range di distribuzione delle MIC nei 2 allevamenti è sovrapponibile

Tabella 8 - Riassunto delle popolazioni batteriche indicatrici con numero (N) degli isolati testati e proporzione (%) di ceppi non-wild con media degli ARI [4].

| | Popolazione indicatrice | N | MDR (%) | ARI medio (range) | Antibiotici testati |
|----------|--------------------------|----|---------|--------------------|---------------------|
| Allev. 1 | <i>E. coli</i> | 20 | 15 | 0.107 (0.0667-0.4) | 15 |
| | <i>Enterococcus spp</i> | 10 | 80 | 0.273 (0.133-0.4) | |
| Allev. 2 | <i>E. coli</i> | 20 | 10 | 0.1 (0-0.534) | 0.254 (0.133-0.467) |
| | <i>Enterococcus spp.</i> | 10 | 60 | | |

Tabella 9 - Numero di sequenze attribuibili a geni codificanti per la resistenza alle varie classi di farmaci antibiotici identificato nei campioni oggetto di analisi.

| Classe di farmaco | Allev.1-CL | Allev. 1-VIT | Allev. 1-M | Allev. 1-VA | Allev. 1-VL | Allev. 1-LM | Allev. 2 -CL | Allev.2-VIT | Allev. 2-M | Allev. 2-VA | Allev. 2-VL | Allev. 2-LM |
|----------------------------------|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| aminoglicosidi | 669 | 4020 | 90 | 64 | 5 | 113 | 0 | 3098 | 19 | 162 | 4 | 298 |
| beta-lattamici | 80 | 501 | 182 | 297 | 283 | 10 | 2 | 1128 | 208 | 306 | 345 | 41 |
| colistina | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| composti quaternari dell'ammonio | 833 | 922 | 221 | 165 | 3 | 926 | 2 | 103 | 50 | 445 | 5 | 1169 |
| fostomicina | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| glicopeptidi | 0 | 5 | 2 | 6 | 6 | 1 | 0 | 27 | 7 | 3 | 3 | 1 |
| macrolidi | 14 | 747 | 155 | 265 | 205 | 1 | 0 | 974 | 202 | 1673 | 378 | 13 |
| nitroimidazoli | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| ossazolidinoni | 1 | 6 | 4 | 8 | 6 | 0 | 0 | 8 | 9 | 10 | 6 | 0 |
| fenicoli | 61 | 691 | 1 | 3 | 0 | 18 | 0 | 442 | 7 | 146 | 2 | 8 |
| Acido Pseudomonico | 2 | 6 | 19 | 10 | 19 | 0 | 0 | 23 | 13 | 8 | 11 | 0 |
| chinoloni | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| rifampicina | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| sulfonamidi | 12 | 478 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 | 170 | 3 | 98 | 1 | 5 |
| tetracicline | 591 | 2986 | 133 | 229 | 340 | 1 | 2 | 8922 | 212 | 320 | 393 | 6 |
| trimetoprim | 13 | 41 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 46 | 1 | 20 | 0 | 3 |
| Totale | 2304 | 10403 | 811 | 1050 | 865 | 1075 | 6 | 14940 | 729 | 3187 | 1146 | 1550 |

Tabella 10

| Allev. | Categoria produttiva | PCR End Point | | | | | | | | ddPCR (copie/ul) | | | | | | % microrganismi positivi nel microbiota | | | | |
|--------|----------------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|---------|---|-------------|-------------|---------------|-------------|
| | | <i>blaCTX</i> | <i>blaTEM</i> | <i>ermB</i> | <i>mcr1</i> | <i>qnrS</i> | <i>sul2</i> | <i>vanA</i> | <i>tetA</i> | <i>sul2</i> | <i>ermB</i> | <i>tetA</i> | <i>blaTEM</i> | <i>qnrS</i> | 16S | <i>sul2</i> | <i>ermB</i> | <i>tetA</i> | <i>blaTEM</i> | <i>qnrS</i> |
| 1 | VL | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | / | | | | | |
| 1 | VA | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | / | | | | | |
| 1 | M | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | / | | | | | |
| 1 | VIT | N | P | P | N | N | P | N | P | 3582 | 7210 | 2090 | 3450 | / | 1432000 | 11,0 | 2,21 | 0,6 | 1 | |
| 1 | LM | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | 687000 | | | | | |
| 1 | CL | N | N | N | N | N | P | N | P | 1440 | / | 3850 | / | / | 293000 | 2,2 | | 5,8 | | |
| 2 | VL | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | / | | | | | |
| 2 | VA | N | N | N | N | N | P | N | N | 3660 | / | / | / | / | 469000 | 3,4 | | | | |
| 2 | M | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | / | | | | | |
| 2 | VIT | N | P | P | N | N | P | N | P | 1400 | 10970 | 910 | 1090 | 5,42 | 210000 | 2,9 | 23 | 1,9 | 2,3 | 0,01 |
| 2 | LM | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | / | | | | | |
| 2 | CL | N | N | N | N | N | N | N | N | / | / | / | / | / | / | | | | | |

Note: N: negativo; P: positivo.

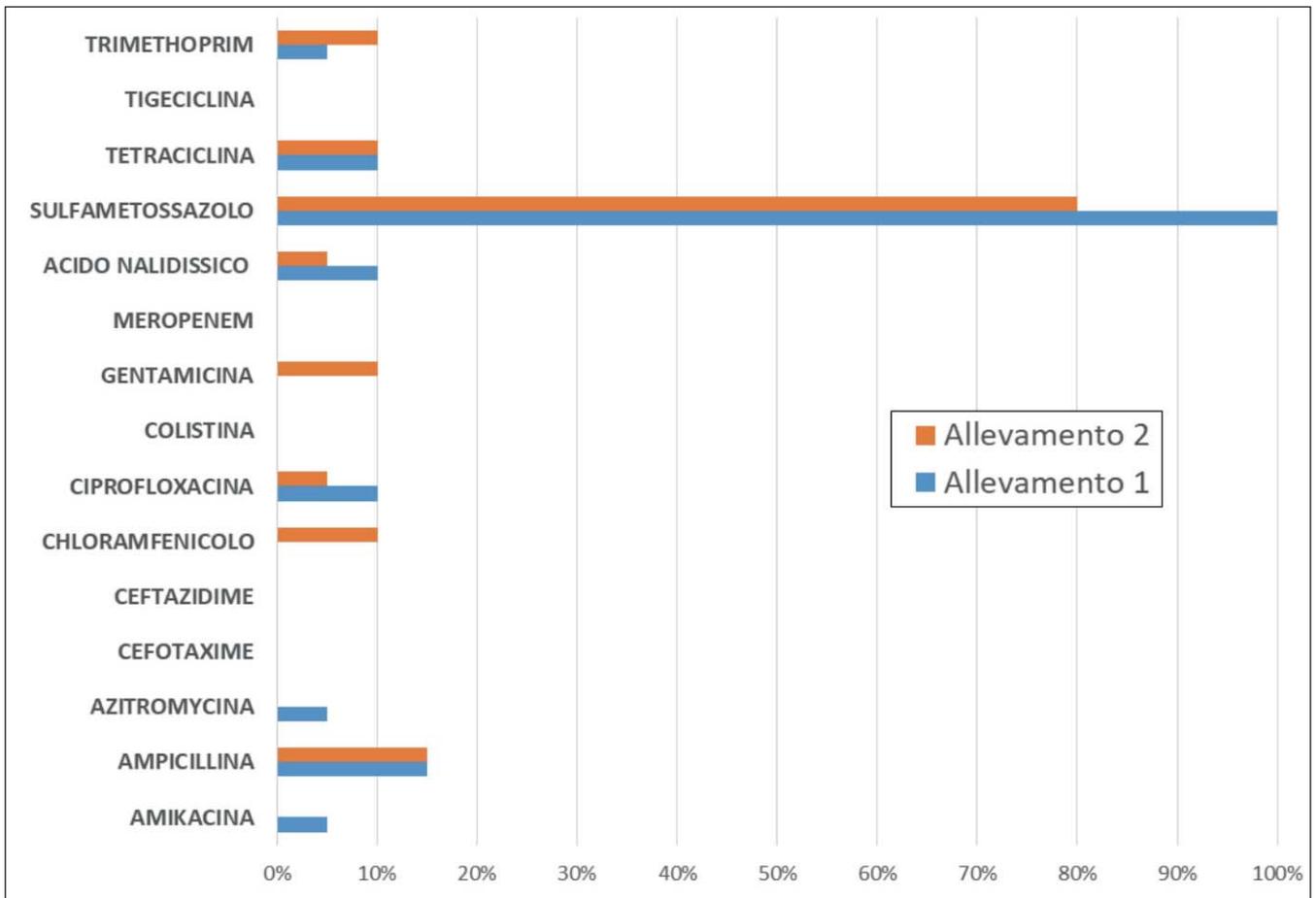


Figura 1 - Percentuale di ceppi "non-wild" di *Escherichia coli* nei due allevamenti in esame.

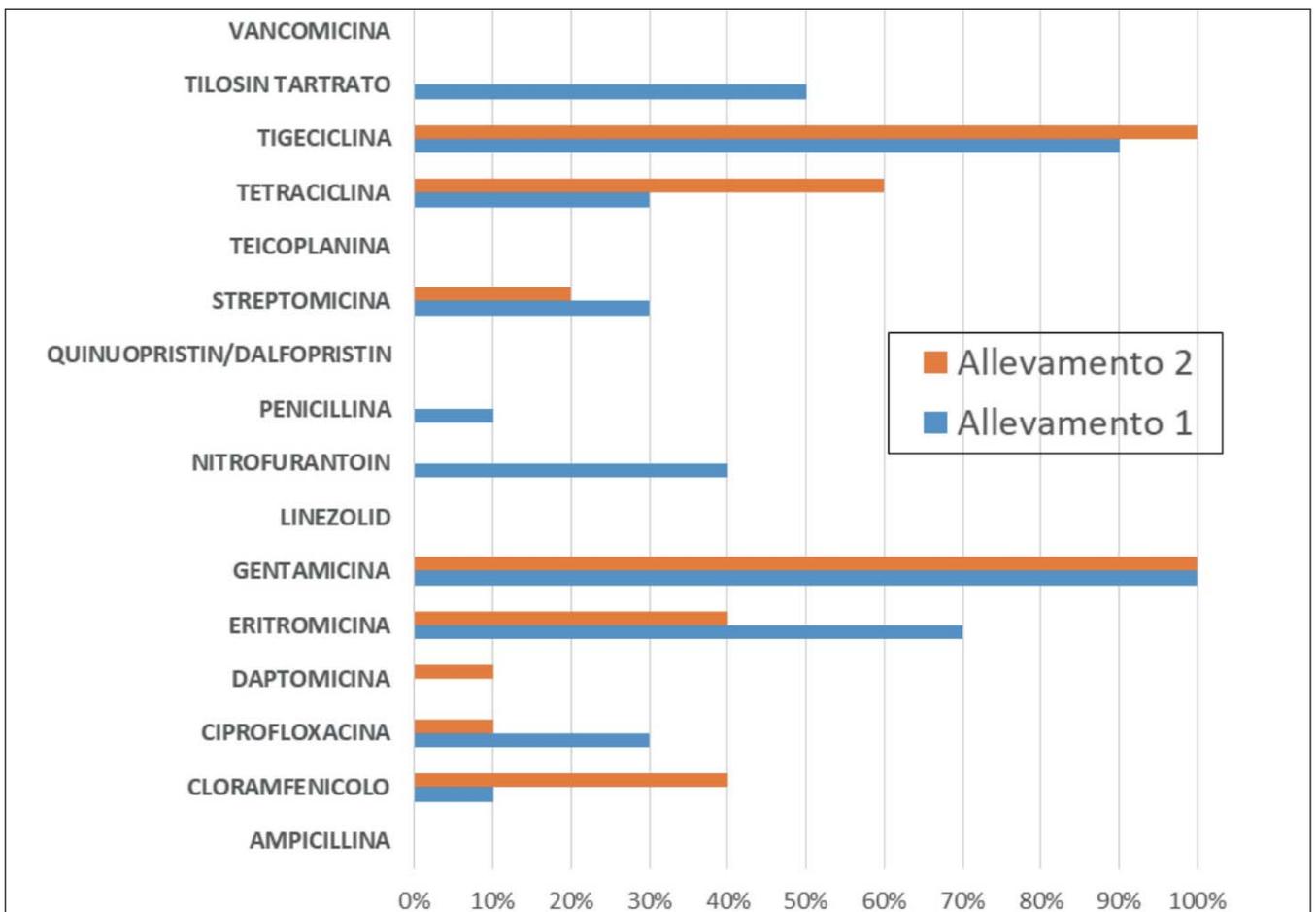


Figura 2 - Percentuale di ceppi "non-wild" di *Enterococcus spp* nei due allevamenti in esame.

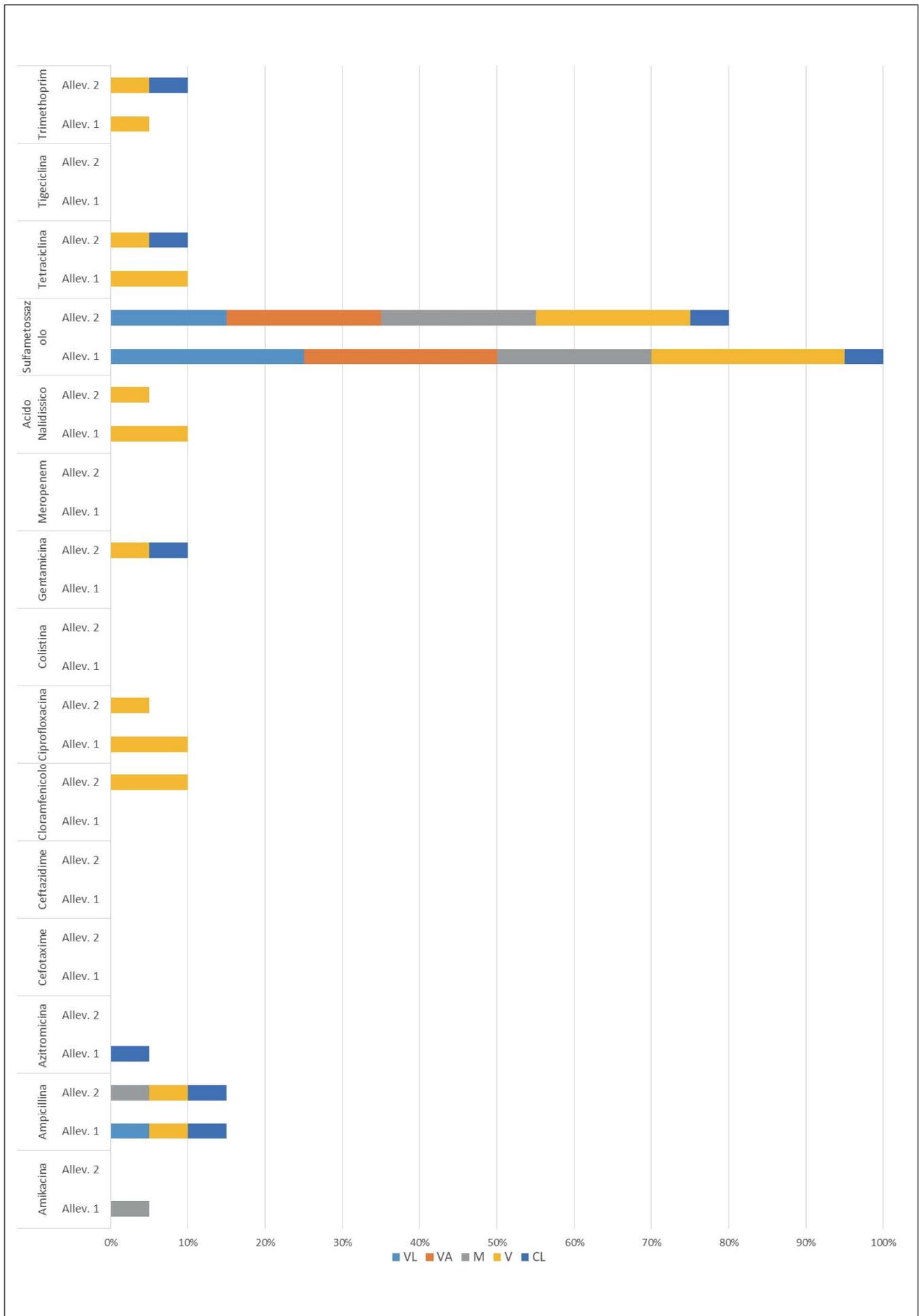


Figura 3 - Distribuzione percentuale dei ceppi di *E.coli* "non-wild" nelle diverse categorie campionate.

(in termini di valore e di frequenza), a testimonianza che non è stato testato più volte uno stesso ceppo (se così fosse gran parte dei valori di MIC dell'allevamento 1 si sarebbero concentrati in un range di diluizioni inferiori rispetto ai ceppi dell'allevamento 2). Inoltre, nell'allevamento "1", per raggiungere la numerosità di enterococchi prevista, sono stati testati anche 5 ceppi di *E. faecium*, oltre a *E. faecalis*. Infine, i risultati fenotipici confermano quelli genotipici, lasciando ipotizzare che l'aggregazione dei campioni dell'allevamento 1 non abbia inciso sui risultati fenotipici di resistenza.

Per quanto riguarda *E. coli*, non sorprende la diffusa antibiotico-resistenza riscontrata nei confronti di sulfamidici, ampiamente riportata in diversi studi condotti sul bovino [5,6]. Sorprende però che i valori di MIC più elevati siano stati riscontrati per tutti i ceppi isolati da vitello e da colostro. Lo stesso comportamento era atteso anche per le tetracicline verso le quali i ceppi testati si sono dimostrati ampiamente sensibili. Infatti, solo 4/40 ceppi sono risultati resistenti: tutti isolati da vitelli e colostro dei 2 allevamenti.

La stessa distribuzione bimodale dei valori di MIC è osservabile anche per ampicillina, ma per questa molecola la maggior parte delle resistenze era presente in ceppi di vitello e nei 2 unici ceppi isolati da colostro, indipendentemente dall'azienda di origine. La resistenza osservata nei vitelli potrebbe essere conseguenza della somministrazione attraverso il colostro di ceppi già resistenti. Dato che questi ceppi resistenti ad ampicillina sembrano non circolare nelle vacche in lattazione (solo 1 ceppo riscontrato nell'allevamento 2), non si esclude che possano essere il frutto di contaminazioni di altro tipo (es. personale di stalla).

Tra i farmaci CIA (*critically important antimicrobials*) non sono state osservate resistenze nei confronti dei carbapenemi, colistina e cefalosporine. Per i fluorochinoloni solo 4 ceppi si sono rivelati resistenti a ciprofloxacina, di cui 3 isolati da vitello e 1 da colostro. Anche per questa classe antimicrobica, le resistenze dei ceppi di *E. coli* veicolati con il colostro potrebbero rappresentare un rischio di persistenza e colonizzazione di vitelli eventualmente esposti a tale molecola.

Tra gli aminoglicosidi, solo nell'allevamento 2 sono stati riscontrati 2 ceppi resistenti isolati rispettivamente da colostro e feci di vitello. Vista la possibilità di co-selezione che tale molecola presenta per altri antimicrobici della stessa classe, è possibile che il dato risenta dei trattamenti con amminosidina/paromomicina che risultano utilizzati in queste aziende.

Gli amfenicoli erano rappresentati dal cloramfenicolo, verso il quale sono state osservate resistenze solo in ceppi isolati da vitelli dell'allevamento 2. Sebbene le resistenze al cloramfenicolo siano abbastanza diffuse in ambiente, non si può escludere un fenomeno di co-selezione in seguito a somministrazione di altra molecola della stessa classe di antimicrobici (es. florfenicolo).

Per quanto riguarda gli enterococchi, non si osservano resistenze nei confronti dei beta-lattamici testati, linezolid, teicoplanina e soprattutto vancomicina: una molecola importante per il trattamento di infezioni enterococciche nell'uomo. Inoltre, gli enterococchi vancomicina-resistenti sono presenti nella lista WHO dei patogeni resistenti prioritari in ambito umano.

I valori di MIC del cloramfenicolo verso gli enterococchi assumono un andamento bimodale con una sub-popolazione di ceppi ampiamente sensibile e una resistente, costituita solo da ceppi isolati da vitelli, di entrambi gli allevamenti.

Anche per gli enterococchi è presente un piccolo gruppo di cep-

pi resistenti a ciprofloxacina, isolati da entrambi gli allevamenti ma, al contrario di quanto evidenziato nei ceppi di *E. coli*, non sono concentrati nella categoria "vitello".

Tutti i ceppi di *Enterococcus* spp. testati sono risultati "non-wild" nei confronti della gentamicina. Tale riscontro potrebbe essere il risultato di una co-selezione operata da amminosidina: l'unico aminoglicoside impiegato in entrambe le aziende. Infatti, l'impiego di aminoglicosidi in allevamenti di vacche da latte si è già dimostrato in grado di selezionare enterococchi resistenti in percentuale significativamente superiore rispetto agli allevamenti che non ne fanno uso [7,8] (Hershberger et al., 2005; Li et al., 2018).

Per tetraciclina e streptomina gli enterococchi testati mostrano 2 sub-popolazioni chiaramente definibili "wild" e "non-wild". In quest'ultima, per streptomina, rientrano solo ceppi isolati da vitelli. Tutti i ceppi di *E. faecalis* sono risultati resistenti alla tigeclina: una glicilciclina assimilabile per spettro ed azione alle tetracicline non registrata negli animali, ma che potrebbe risentire di fenomeni di co-selezione da parte di altre molecole. Undici ceppi su venti di enterococchi sono risultati resistenti all'eritromicina. Tra questi figurano 6 ceppi isolati da vitello. Tale molecola, infatti, è stata utilizzata in allevamento in una preparazione contenente sulfamidico e può aver contribuito all'insorgenza di ceppi resistenti.

I risultati delle analisi fenotipiche non hanno messo in evidenza differenze significative tra i valori di ARI riscontrati nelle 2 aziende considerate a testimonianza che, sebbene il valore di DDD fosse diverso, questo non influenza il livello di resistenze laddove il consumo complessivo sia comunque modesto (inferiore alla media nazionale per entrambi gli allevamenti).

Le analisi genotipiche riguardo l'abbondanza di geni di antibiotico-resistenza (ARGs) hanno fornito risultati comparabili con quanto riportato in altri allevamenti italiani e aziende sottoposte a campionamento in altri paesi [3, 9, 10, 11]. Questo risultato evidenzia ancora la necessità di approfondire il ruolo delle aziende come luoghi di diffusione di ARG nell'ambiente e di esposizione per l'uomo [12, 13]. In dettaglio, i più abbondanti ARG quantificati erano *ermB* e *Sul2*, entrambi in concentrazioni dell'ordine di 10^{-1} copie/copia di rDNA 16S normalizzato, usato come proxy della numerosità della comunità microbica oggetto di analisi. Il gene *ermB*, responsabile della resistenza contro macrolidi, lincosamine e streptogramina B, è stato recentemente classificato nel rango "I" delle famiglie di ARG, identificato come a più alto rischio per la salute dell'uomo [13]. Il gene *sul2*, è diffuso e costitutivamente presente nell'ambiente e quindi, non è stato sorprendente trovare un'alta concentrazione di questo gene in campioni fecali [14, 15]. Un altro ARG classificato nel grado "I" era *blaTEM*, che è stato il secondo più abbondante ARG quantificato in questo studio (dell'ordine di 10^{-2} copie del gene/rRNA 16S copia del gene). I geni, *blaCTXM*, *qnrS*, e *mcr-1*, tutti classificati come ARGs di rango I oltre a *VanA*, che codifica per la resistenza alla vancomicina, non sono stati rilevati in alcuna azienda [13].

Come detto sopra, nel presente studio, abbiamo studiato le dinamiche degli ARGs lungo la filiera produttiva delle due diverse aziende agricole, ed è emerso che la categoria dei vitelli è quella più a rischio di diffondere geni di AR rispetto alle altre. Questo risultato è in accordo con quanto precedentemente rilevato Salerno *et al.* (2022) [3]. Inoltre Liu *et al.* (2019) ha attribuito un ruolo al colostro quale fonte principale di ARGs nell'intestino dei vitelli [16]. Infatti la matrice "colostro" ha mostrato possedere un elevato carico di geni di antibiotico resistenza. Tut-

tavia, il nostro risultato è confortante perché evidenzia che il carico di ARG diminuisce lungo la filiera di produzione. Si evidenzia, come per altri studi, un importante ruolo del vitello come reservoir di ceppi antimicrobicoresistenti, indipendentemente dall'utilizzo della corrispondente molecola antibiotica in allevamento. Si ricorda infatti che l'insorgenza di antibioticoresistenze all'interno di popolazioni microbiche è un fenomeno naturale che solo l'esposizione all'antimicrobico in questione può amplificare. Vista la possibilità di una trasmissione orizzontale di elementi genetici di resistenza tra specie microbiche diverse, la conoscenza del livello di resistenze in allevamento dovrebbe essere considerato quando si stabilisce una terapia antibiotica, soprattutto nei vitelli. Un elemento di novità che emerge dallo studio è la presenza di ceppi di *E. coli* multiresistenti nel colostro, e questo potrebbe costituire un fattore di rischio per la colonizzazione intestinale precoce e la successiva disseminazione di ceppi resistenti in vitellaia. La somministrazione di latte di bovine trattate con antimicrobici è un ulteriore elemento di rischio nella selezione di tali microrganismi e deve pertanto essere evitata.

CONCLUSIONI

I risultati dello studio non hanno evidenziato differenze nei profili di resistenza delle popolazioni commensali indicatrici e nella quantificazione di ARGs dei 2 allevamenti, nonostante il diverso consumo di antimicrobico (espresso in DDD). I vitelli si confermano essere la categoria a rischio nel mantenimento e possibile diffusione delle AMR nelle aziende di bovine da latte, con la crescita di questi animali però, si assiste ad una drastica riduzione delle forme di resistenza, fino a scomparire nelle manze e nelle vacche da latte. Un elemento di novità che emerge dallo studio è la presenza di ceppi di *E. coli* multiresistenti e di geni ARGs nel colostro, possibile elemento di rischio per la colonizzazione intestinale precoce dei vitelli da parti di popolazioni microbiche multiresistenti. La pratica di somministrare il latte di bovine trattate con antimicrobici ai vitelli va sicuramente evitata. È, quindi, cruciale ribadire il ruolo che l'ambiente zootecnico gioca nel mantenimento delle AMR e stabilire sistemi di sorveglianza in grado di capire il loro carico e significato.

Dichiarazione del conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interessi.

Finanziamenti

La ricerca si è svolta nell'ambito del DDG 95/22 Contratto CR tra IZSve e l'azienda Fatro SpA. - Industria farmaceutica veterinaria.

References

- WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, ATC/DDD index. 2018. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Oslo. Available from: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/.
- EFSA 2019 (European Food Safety Authority). 2019. «Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food producing animals and food.» EFSA Journal 17(6): e05709.
- Salerno, B., Cornaggia, M., Sabatino, R., Di Cesare, A., Furlan, M., Barco, L., Orsini, M., Cordioli, B., Mantovani, C., Bano, L. & Losasso, C. 2022. Calves as Main Reservoir of Antibiotic Resistance Genes in Dairy Farms. *Front Public Health*, 10, 918658.
- Agnoletti, F., Brunetta, R., Bano, L., Drigo, I., & Mazzolini, E. 2018. Longitudinal study on antimicrobial consumption and resistance in rabbit farming. *J. Antimicrob. Agents*, 51(2): 197-205.
- Gow, S. P., Waldner, C. L., Harel, J., & Boerlin, P. 2008. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Appl Environ Microbiol*, 74(12): 3658-3666.
- Adnan, M., Khan, H., Kashif, J., Ahmad, S., Gohar, A., Ali, A., Khan, M.A., Shah, S.S.A., Hassan, M.F., Irshad, M., Khan, N. A., Rahman, S. 2017. Clonal expansion of sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates recovered from diarrheic calves. *Pak. Vet. J.*, 37(2): 230-232.
- Hershberger, E., Oprea, S. F., Donabedian, S. M., Perri, M., Bozigar, P., Bartlett, P., Zervos, M. J. 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55(1): 127-130.
- Li, X., Aly, S. S., Su, Z., Pereira, R. V., Williams, D. R., Rossitto, P., Champagne, J.D., Chase, J., Nguyen, T., Atwill, E. R. 2018. Phenotypic antimicrobial resistance profiles of *E. coli* and *Enterococcus* from dairy cattle in different management units on a central California dairy. *Clin Microbiol*. 7(311): 2.
- Petrin, S., Patuzzi I., Di Cesare, A., Tiengo, A., Sette, G., Biancotto, G., Corno, G., Drigo, M., Losasso, C., Cibin, V. 2019. Evaluation and quantification of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in two Italian swine farms. *Environ. Pollut.* 255:113183. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113183
- Cheng, W., Chen, H., Su, C., Yan, S. 2013. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China. *Environ. Int.* 61:1-7. doi: 10.1016/j.envint.2013.08.023
- Qian, X., Gunturu, S., Sun, W., Cole, J.R., Norby, B., Gu, J., Tiedje, J.M. 2021. Long-read sequencing revealed cooccurrence, host range, and potential mobility of antibiotic resistance in cow feces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 118:e2024464118. doi: 10.1073/pnas.2024464118
- Ding, D., Zhu, J., Gao, Y., Yang, F., Ma, Y., Cheng, X., Li, J., Dong, P., Yang, H., Chen, S. 2022. Effect of cattle farm exposure on oropharyngeal and gut microbial communities and antibiotic resistance genes in workers. *Sci. Total Environ.* 806:150685. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150685
- Zhang, A. N., Gaston, J. M., Dai, C. L., Zhao, S., Poyet, M., Groussin, M., Yin, X., Li, L., van Loosdrecht, M. C. M., Topp, E., Gillings, M. R., Hanage, W. P., Tiedje, J.M., Moniz, K., Alm, E.J., Zhang, T. 2021. An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes. *Nat Commun.* 12:4765. doi: 10.1038/s41467-021-25096-3
- Di Cesare, A., Eckert, E.M., Teruggi, A., Fontaneto, D., Bertoni, R., Callieri, C., Corno, G. 2015. Constitutive presence of antibiotic resistance genes within the bacterial community of a large subalpine lake. *Mol Ecol*. 24:3888-900. doi: 10.1111/mec.13293
- Di Cesare, A., Petrin, S., Fontaneto, D., Losasso, C., Eckert, E.M., Tassistro, G., Borello, A., Ricci, A., Wilson, W.H., Pruzzo, C. Vezzulli, L. 2018. ddPCR applied on archived continuous plankton recorder samples reveals long-term occurrence of class 1 integrons and a sulphonamide resistance gene in marine plankton communities. *Environ Microbiol Rep.* 10:458-64. doi: 10.1111/1758-2229.12665
- Liu, J., Taft, D.H., Maldonado-Gomez, M.X., Johnson, D., Treiber, M.L., Lemay, D.G., DePeters, E.J., Mills, D.A. 2019. The fecal resistome of dairy cattle is associated with diet during nursing. *Nat Commun.* 10:4406. doi:10.1038/s41467-019-12111-x.