

PREVALENZA DI STIPITI ANTIBIOTICO RESISTENTI DI ESCHERICHIA COLI E ENTEROCOCCUS SPP. IN CAPRIOLI (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) E CERVI (*CERVUS ELAPHUS*) NEL PARCO NAZIONALE DEI MONTI SIBILLINI

PREVALENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT STRAINS OF ESCHERICHIA COLI AND ENTEROCOCCUS SPP. IN ROE DEER (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) AND RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*) AT THE PARCO NAZIONALE DEI MONTI SIBILLINI, ITALY

Cenci Goga B., Vizzani A., Monticelli C., Nicchiarelli I., Sechi P., Pisano I.
Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Perugia

SUMMARY

A case control study was performed in the Parco Nazionale dei Monti Sibillini, Italy, to find out whether roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) were more likely to harbour antibiotic resistant *Escherichia coli* in their faeces, compared to *Enterococcus* spp. Ten areas were selected and samples were collected during a four-months (May to August, 2008) sampling period. Samples of water (n=12) and feces (n=59), collected at 10 different sites, were cultured for *E. coli* and *Enterococcus* spp. The resulting colonies were screened for tetracycline, ampicillin and kanamycin resistance using the Lederberg Replica Plating method (breakpoint 4 µg/ml). All resistant isolates were then selected, and subjected to the CLSI antimicrobial plate susceptibility test (7). Among the water specimens contaminated by *E. coli*, 80% were found to be resistant to ampicillin, 80% to tetracycline and 40% to kanamycin. Among the water specimens contaminated by *Enterococcus* spp., 14.29% were found to be resistant to ampicillin, 14.29% to tetracycline and 71.3% to kanamycin. Among the 39 strains of *E. coli* isolated from red deer feces, 12 were resistant to ampicillin (30.77%), 5 to tetracycline (12.82%) and 3 to kanamycin (7.69%). Among the 19 strains of *Enterococcus* spp. isolated from red deer feces, 0 were resistant to ampicillin (0%), 1 to tetracycline (5.26%) and 19 to kanamycin (100). These are significant findings, indicating that antibiotic resistance can be found in naïve animal populations and that red deer and fallow deer could act as sentinels for antimicrobial resistance.

Key words

Antibiotic-resistance, red deer, fallow deer, *Escherichia* spp., *Enterococcus* spp.

INTRODUZIONE

L'uso degli antibiotici ha svolto un ruolo importante in diversi settori sia della medicina umana che di quella veterinaria. Più della metà degli antibiotici usati sono impiegati in medicina veterinaria, in gran parte come promotori della crescita e a scopo profilattico e metafilattico e, in minor misura, a scopo terapeutico. In medicina umana l'impiego del-

l'antibiotico è prevalentemente a scopo terapeutico. Gli antibiotici usati per trattare o prevenire le infezioni batteriche negli animali appartengono sostanzialmente alle medesime classi di quelli usati nell'uomo. Da alcuni dati pubblicati nel 1997 dalla FEDESA/FEFANA (1), riguardanti il consumo degli agenti antimicrobici nell'Unione Europea, si afferma che la maggior parte dei farmaci usati in terapia veterinaria sono rappresentati dalle tetracicline (2).

Prima del 1999 alcune sostanze, come macrolidi e glicopeptidi, usate in veterinaria come promotori della crescita erano impiegate anche in medicina umana a scopo terapeutico. Dal 1999 gli unici promotori della crescita autorizzati dall'Unione Europea sono solo antibiotici non impiegati né in medicina veterinaria né in medicina umana, inoltre, l'antibiotico terapeutico deve essere disponibile solo per uso veterinario e solo se prescritto da un veterinario (1). Diverse sostanze sono state vietate e/o ritirate dall'uso per resistenza incrociata verso glicopeptidi (vancomicina, teicoplanina), macrolidi (eritromicina, claritromicina) e streptogramina usati in terapia umana; per conservare l'efficacia di agenti terapeutici in medicina umana (Zn-bacitracina) o per aspetti tossicologici (chinoloni). Si è osservato un buon rapporto tra uso di un particolare promotore della crescita, in una data specie animale, e casi di resistenza. Per esempio, la tilosina, in Danimarca, è stata il promotore della crescita più comunemente usato nel 1996 nell'allevamento suino e quasi il 90% di *Enterococcus faecium* si è dimostrato resistente al contrario dell'avilamicina che, usata solo raramente allo stesso scopo, ha determinato resistenza solo in meno dell'1% dei casi. Tra i broiler lo stesso antibiotico, usato come maggior promotore della crescita, ha determinato resistenza nell'80% dei casi (3). Uno studio epidemiologico condotto in Danimarca nel 1995 mostrò una stretta associazione tra uso di avoparcina, come promotore della crescita, e casi di resistenza in enterococchi isolati da broiler e suini (4). Altri studi (5; 6) hanno dimostrato che diversi geni che codificano per diversi meccanismi di antibiotico resistenza in germi enterici, in particolare *Escherichia coli* ed *Enterococcus* spp., possono essere trasferiti tra i batteri in diversi ecosistemi. *E. coli* ed *Enterococcus* spp. sono stati scelti come germi indicatori nel presente studio, poiché presenti nel tratto intestinale dell'uomo e degli animali. È stato inoltre ipotizzato che i germi commensali dell'apparato digerente di animali non esposti ad antibiotici hanno bassi (o nulli) livelli di antibiotico resistenza (7). La presenza di microrganismi resistenti

in animali selvatici non esposti a pressione selettiva può essere utilizzata come modello per studiare la diffusione dell'antibiotico resistenza nell'ambiente. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la prevalenza di stipiti antibiotico resistenti di *E. coli* e di *Enterococcus* spp. in caprioli (*Capreolus capreolus*) e cervi (*Cervus elaphus*) in un ambiente naturale non esposto a trattamenti antibiotici, il Parco Nazionale dei Monti Sibillini.

MATERIALI E METODI

Area di studio. Il Parco Nazionale dei Monti Sibillini è stato scelto come area di studio per la ricerca. I Monti Sibillini sono un gruppo montuoso situato nel Centro Italia che si estende da Nord a Sud per oltre 30 Km. Il suo crinale funge da spartiacque fra il mare Adriatico (Est) e mare Tirreno (Ovest). Tutte le sue cime principali (oltre m 2000) sono comprese nel Parco Nazionale dei Monti Sibillini (www.sibillini.net). I confini del Gruppo non trovano ancora una collocazione precisa e in molti punti differiscono da quelli del Parco. Nel presente lavoro, secondo le attuali indicazioni, il Gruppo è delimitato nel modo seguente e con i seguenti sottogruppi cominciando da Nord: 1 - del Monte Rotondo, 2 - del Monte Bove e Pizzo Regina (o Priora), 3 - del Monte Bellavista e del Monte Sibilla, 4 - del Monte Vettore, 5 - del Monte Fiegni, 6 - del Cardoso-Poggio di Croce - Ventosola - Macchialta, 7 - del Monte Cavogna, 8 - del Monte Utèro e Monte Pizzuto (Pozzoni), 9 - del Monte Ceresa. Di conseguenza partendo da N-W e dal fiume Chienti (confluenza del Chienti di Gelagna con il Chienti di Pieve Torina (343329 - 4771307) si assume per confine occidentale la SS 209 che passa per Pieve Torina (Chienti di Pieve Torina sino a quota m 519 // Kmetrico 82 c.ca // Fosso Caspreano m 539 // Fossa di Capriglia m 588 Petraioli // Fossa di Corlano sino a m 815) e (Valico delle Fornaci m 815 // 343423 - 4758734) scende a Visso (Fosso delle Rote) per immettersi sempre sulla Strada Statale sulla Valnerina (Fiume Nera) sino ad

Tabella 1. Replica plating

<i>E. coli</i> replicato su:	VRBL	Crom.	BGA	XLD	McS	AMP	T	K
<i>Enterococcus</i> spp. replicato su	-	-	-	-	-	AMP	T	K

VRBL: violet red bile lactose, Crom: cromogeno per Salmonella, BGA: brilliant green agar, XLD: Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar, McS: McConkey sorbitolo, AMP: Mueller Hinton agar addizionato di ampicillina in ragione di 4 µg/ml, T: Mueller Hinton agar addizionato di tetraciclina in ragione di 4 µg/ml, Mueller Hinton agar addizionato di kanamicina in ragione di 4 µg/ml (OXOID).

incontrare la fine della Valle del Campiano (Ponte Chiussita m 454 // 336102 - 4749198). Prosegue ancora sulla strada statale ed il Nera sino a Triponzo. Da qui il confine risale il Fiume Corno con la SS n° 320 sino al Bivio per Cascia, prosegue poi per la Strada Statale 396 sino Serravalle, il confine geografico è il fiume Sordo. Da qui si assume per confine la strada che, attraversando la Piana di Santa Scolastica (che incontra sulla sinistra il bivio multinodale per Tronto e Ascoli Piceno // Forca Canapine // Castelluccio), sale a Savelli, lambisce la Madonna della Neve (m 1077, // 345619 - 4730701) e prosegue sino alla Forca della Civita (m 1225 // 345925 - 4728834). Da qui prosegue a Sud dove incontra il fiume Tronto (Strada Statale Salaria n° 4 // m 884 // 349351 - 4716386) . Seguendo la Salaria verso il mare (ed il fiume Tronto) arriva all'incrocio della (a

destra) SS n° 78 (per Comunanza, Amandola, Sarnano, Santa Maria di Pieca) e alla confluenza del fiume Fluvione con il Tronto (m 206 // 378148 - 4742231). Da qui per la Strada Statale n° 78 (e il Fluvione) sino al Km 70 e a quota m 360, si può assumere per confine la citata SS n° 78 sino a Comunanza, Amandola, Samano, Santa Maria di Pieca (m 468 // 359963 - 4770727). Da qui si assume per confine la Strada n° 502 che, dopo aver attraversato Caldarola, ritorna al fiume Chienti, e Valdichienti, a Caccamo sul Lago (m 293 // 354298 - 4778656). A questo punto, costeggiando i laghi (Caccamo e Polverina) e il Chienti sulla loro sinistra idrografica, si chiude tornando alla confluenza con il Chienti di Pieve Torina. **Raccolta dei campioni** - I campioni di feci e di acque sono stati raccolti nel periodo Maggio-Agosto 2008. Nel corso di 10 uscite sono stati

Tabella 2. Positività agli antibiotici di screening

<i>Escherichia coli</i> (feci di cervo)				
n. campioni saggiati/n. campioni con crescita	<i>E. coli</i>	AMP	TE	K
55/38	18	12	12	15
69,09%	47,37%	31,58%	31,58%	39,47%
<i>Escherichia coli</i> (feci di capriolo)				
n. campioni saggiati/n. campioni con crescita	<i>E. coli</i>	AMP	TE	K
4/2	0	0	0	0
50%	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (acqua)				
n. campioni saggiati/n. campioni con crescita	<i>E. coli</i>	AMP	TE	K
12/8	7	6	4	5
66,67%	87,5%	75%	50%	62,5%
<i>Enterococcus spp.</i> (feci di cervo)				
n. campioni saggiati/n. campioni con crescita		AMP	TE	K
55/29		6	1	11
52,72%		20,69%	3,45%	37,93%
<i>Enterococcus spp.</i> (feci di capriolo)				
n. campioni saggiati/n. campioni con crescita		AMP	TE	K
4/0		0	0	0
-		-	-	-
<i>Enterococcus spp.</i> (acqua)				
n. campioni saggiati/n. campioni con crescita		AMP	TE	K
12/6		6	2	4
50%		100%	33,33%	66,67%

raccolti 71 campioni così suddivisi: 55 campioni di feci di cervo, 12 campioni di acqua, 4 campioni di feci di capriolo, dai quali sono stati isolati 234 microrganismi dopo screening per la resistenza a 4µg/ml di tetraciclina, ampicillina e kanamicina. Il punto di prelievo è stato identificato con le coordinate GPS (global positioning system) utilizzando un computer palmare Palm LifeDrive dotato di ricevitore GPS. Le coordinate, Longitudine e Latitudine, sono state trasferite in Google Maps (maps.google.com). I campioni dei corsi d'acqua sono stati raccolti in bottiglie sterili con tappo a vite da 500 ml (Pyrex), mentre i campioni di feci sono stati raccolti con guanti sterili e trasferiti in buste sterili «presto chiuso» (PBI International, Milano). **Isolamento di enterobatteri**

e enterococchi - Sono state effettuate diluizioni decimali in acqua peptonata (PW Difco, Detroit, MI, USA) dei campioni di acqua e di feci. Ciascun campione di feci è stato diluito 1:10 ed omogeneizzato in Stomacher 400 (PBI, Milano) prima dell'allestimento delle diluizioni. Le diluizioni sono state inoculate sui terreni di coltura (Tabella 1) utilizzando 1 ml per la semina per inclusione e 0,1 e 0,01 ml per quella in superficie. È stato utilizzato il Barnes agar (BA, Biolife, Milano, Italy) addizionato di trifenil-tetrazolio cloruro (10mg/100ml) a 42°C per 48-72 ore: tutte le colonie rosso scuro o marrone e bianche o rosa sono state conteggiate come *Enterococcus* spp. Gli enterobatteri totali su Violet Red Bile agar (VRB, Biolife), a 32°C per 24 ore. **Screening con**

Tabella 3. Antibiogrammi dagli stiptiti con almeno una positività allo screening. Percentuale degli stiptiti resistenti (numero stiptiti/positivi)

<i>Escherichia coli</i> (feci di cervo).								
AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC	
39/12	39/0	39/3	39/5	39/1	39/0	39/11	39/12	
30,77	0	7,69	12,82	2,56	0	28,21	30,77	
<i>Escherichia coli</i> (feci di capriolo)								
AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC	
0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Escherichia coli</i> (acqua).								
AMP	CIP	K	TE	CN	NA	N	AMC	
5/4	5/0	5/2	5/4	5/4	5/3	5/3	5/1	
80	0	40	80	80	60	60	20	
<i>Enterococcus</i> spp. (feci di cervo)								
AMP	CIP	K	TE	CN	E	AMC	F	VA
19/0	19/3	19/19	19/1	19/14	19/1	19/0	0	19/3
0	15,79	100	5,26	73,68	5,26	0	-	15,79
<i>Enterococcus</i> spp. (feci di capriolo)								
AMP	CIP	K	TE	CN	E	AMC	F	VA
0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i> spp. (acqua)								
AMP	CIP	K	TE	CN	E	AMC	F	VA
14/2	14/5	14/10	14/2	13/8	14/0	12/2	10/1	14/4
14,29	35,71	71,43	14,29	61,54	0	16,67	10	28,57

Legenda: AMP: ampicillina, CIP: ciprofloxacina, K: kanamicina, TE: tetraciclina, CN: gentamicina, E. eritromicina, AMC: amoxicillina + acido clavulanico, F: nitrofurantoina, VA: vancomicina, N: neomicina.

«**replica plating**» - Una piastra di VRB e una di BA che mostravano crescita di un numero di colonie ben separate, compreso tra 30 e 50, è stata replicata, secondo il metodo originariamente descritto da Lederberg (8; 9), su altri terreni, compresi quelli con aggiunta di antibiotico, come da schema che segue (Tabella 1). Per *E. coli* ulteriore conferma con semina su BGB e acqua peptonata (prova dell'indolo) a 44°C. Tutte le colonie positive su VRBG, BGA e McS e negative su Cromogeno e XLD sono state conteggiate nelle piastre con i tre antibiotici di screening per aminoglicosidi (Kanamicina), polichetidi/tetracicline (Tetraciclina) e penicilline/beta lattamici (Ampicillina). La presenza di una sola colonia resistente a 4µg/ml di antibiotico è stata valutata come campione positivo. Tutte le colonie selezionate sono state trasferite in brodo TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid, Basingstoke, UK) e congelate a -80 °C fino alle successive analisi di conferma. **Antibiogrammi** - La tecnica impiegata si basa sul metodo di diffusione in agar (10). Sono stati usati due pannelli di antibiotici (Tabella 3). **Analisi statistica** - I dati sono riportati come tasso di rilevazione (numero di campioni positivi/numero di campioni prelevati e analizzati). È stato utilizzato il «test esatto per tabelle 2 x 2» (*Fisher exact test*) per valutare se i microrganismi ricercati (*E. coli* vs. *Enterococcus* spp.) avevano un impatto statisticamente significativo sul tasso di rilevazione. Per l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il software GraphPad InStat, versione 3.0b per Mac OS X.

RISULTATI

I risultati sono riassunti nelle tabelle 2 e 3. Nella tabella 2 sono raffigurate le positività allo screening iniziale per ampicillina (AMP), tetraciclina (TE) e kanamicina (K). Nella tabella 3 sono raffigurati i risultati degli antibiogrammi. Al primo test di screening, effettuato con il metodo del replica plating, sono risultati resistenti alla ampicillina il 31,58% degli stipiti di *E. coli* isolati da feci di cervo e il 20,69% degli enterococchi e resistenti alla tetraciclina il 31,58% degli stipiti di *E. coli* e il 3,45% degli stipiti di *Enterococcus* spp. Il 39,47% degli stipiti di *E. coli* e il 37,93% degli stipiti di *Enterococcus* spp. erano resistenti alla kanamicina. Le prove di conferma effettuate con gli antibiogrammi hanno mostrato, nei germi isolati da feci di cervo, percentuali del 30,77%, 12,82% e 7,69%, rispettivamente per ampicillina, tetraciclina e kanamicina in *E. coli* e del 0%, 5,26% e 100% per gli stessi antibiotici in *Enterococcus* spp. L'analisi dei microrganismi isolati

dalle acque di abbeverata ha permesso di evidenziare resistenze variabili tra l'80% (*E. coli* nei confronti dell'ampicillina) e il 14,29% (*Enterococcus* spp. nei confronti dell'ampicillina) e di isolare 6 stipiti resistenti all'ampicillina (4 di *E. coli* e 2 di *Enterococcus* spp.) e 5 alla tetraciclina (1 di *Enterococcus* spp. e 4 di *E. coli*). L'analisi statistica ha evidenziato che la differenza tra *E. coli* e *Enterococcus* spp. resistenti alla ampicillina, alla ciprofloxacina e alla gentamicina è statisticamente significativa al livello di probabilità dello 0,05 e che, limitatamente ai risultati dello screening con replica plating (4µg/ml di antibiotico nel terreno di coltura), la differenza tra *E. coli* e *Enterococcus* spp. resistenti alla tetraciclina è statisticamente significativa al livello di probabilità dello 0,05. Non sono state evidenziate differenze significative per gli altri antibiotici.

DISCUSSIONE

Nel corso della sperimentazione sono stati isolati da feci di cervo 12 stipiti di *E. coli* resistenti all'ampicillina, 5 alla tetraciclina, uno alla gentamicina, mentre tra i germi appartenenti al genere *Enterococcus* 3 resistenti alla ciprofloxacina, uno resistente alla tetraciclina e 14 alla gentamicina. Dalle acque di abbeverata sono stati isolati 4 *E. coli* resistenti all'ampicillina, 4 alla tetraciclina e 4 alla gentamicina e 2 enterococchi resistenti all'ampicillina, 5 alla ciprofloxacina, 2 alla tetraciclina e 8 alla gentamicina. In base ai risultati del Fisher exact test l'elaborazione statistica ha permesso di concludere che è più facile (95% di probabilità) isolare da feci di cervo *E. coli* resistenti all'ampicillina piuttosto che *Enterococcus* spp., mentre è più facile isolare *Enterococcus* spp. resistenti a ciprofloxacina e gentamicina. Sebbene questo dato confermi le conoscenze attuali, in base alle quali la resistenza all'ampicillina da parte di *Enterococcus* spp. è un evento raro, il riscontro di stipiti di *Enterococcus* spp. resistenti all'ampicillina dai luoghi di abbeverata è un primo campanello di allarme circa la diffusione della resistenza all'ampicillina anche ad ambienti che si ipotizza non contaminati, come i parchi nazionali. Desta preoccupazione anche il riscontro di 5 stipiti di *Enterococcus* resistenti alla tetraciclina (4 dalle acque e 1 da feci di cervo) e l'evidenziazione in uno di questi dei gene tetM e tetO (dati non presentati). Questa indagine conoscitiva ha permesso di dimostrare che anche in ambienti considerati "incontaminati", come i parchi nazionali, è possibile isolare microrganismi resistenti agli antibiotici. Con i dati fin qui ottenuti va posta una riserva in merito ad un

ipotetico flusso di contaminazione tra animali allevati e fauna selvatica o ad altri meccanismi, al momento sconosciuti o nemmeno ipotizzabili. È con il prosieguo della ricerca e con l'estensione dei capi osservati anche alle specie allevate, in particolare quella ovina, dove è ipotizzabile l'esistenza di una pressione selettiva causata dall'impiego di chemioterapici, che ci auguriamo di poter sciogliere la riserva.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T. R. (2001). "Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production." *International Journal of Antimicrobial Agents* 7: 431-437.
- 2) Cenci Goga, B. T., Crotti, S., Costarelli, S., Rondini, C., Karama, M. and Bennett, P. (2004). "Detection of tet(M) gene from raw milk by rapid DNA extraction followed by a two-step PCR with nested primers." *Journal of Food Protection* 67(12): 2833-2838.
- 3) Aarestrup, F. M. (1999). "Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals." *International Journal of Antimicrobial Agents* 12: 279-285.
- 4) Bager, F., Madsen, M., Christensen, J. and Aarestrup, F. M. (1997). "Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms." *Preventive Veterinary Medicine* 31: 95-112.
- 5) Bryan, A., Shapir, N. and Sadowsky, M. J. (2004). "Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources." *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2503-2507.
- 6) Kruse, H. and Sorum, H. (1994). "Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments." *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4015-4021.
- 7) Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y. and Miller, R. A. (2005). "Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water." *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1394-1404.
- 8) Lederberg, J. and Lederberg, E. M. (1952). "Replica plating and indirect selection of bacterial mutants." *Journal of Bacteriology* 63: 399-406.
- 9) Osterblad, M., Leistevuo, T. and Huovinen, P. (1995). "Screening for antimicrobial resistance in fecal samples by the replica plating method." *Journal of Clinical Microbiology* 33: 3146-3149.
- 10) NCCLS/CLSI (2002). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standards. M31-A2. Wayne, PA.