



Valutazione della diffusione di  
*Enterobacteriaceae* produttrici di  
beta-lattamasi a spettro esteso  
nella filiera suina

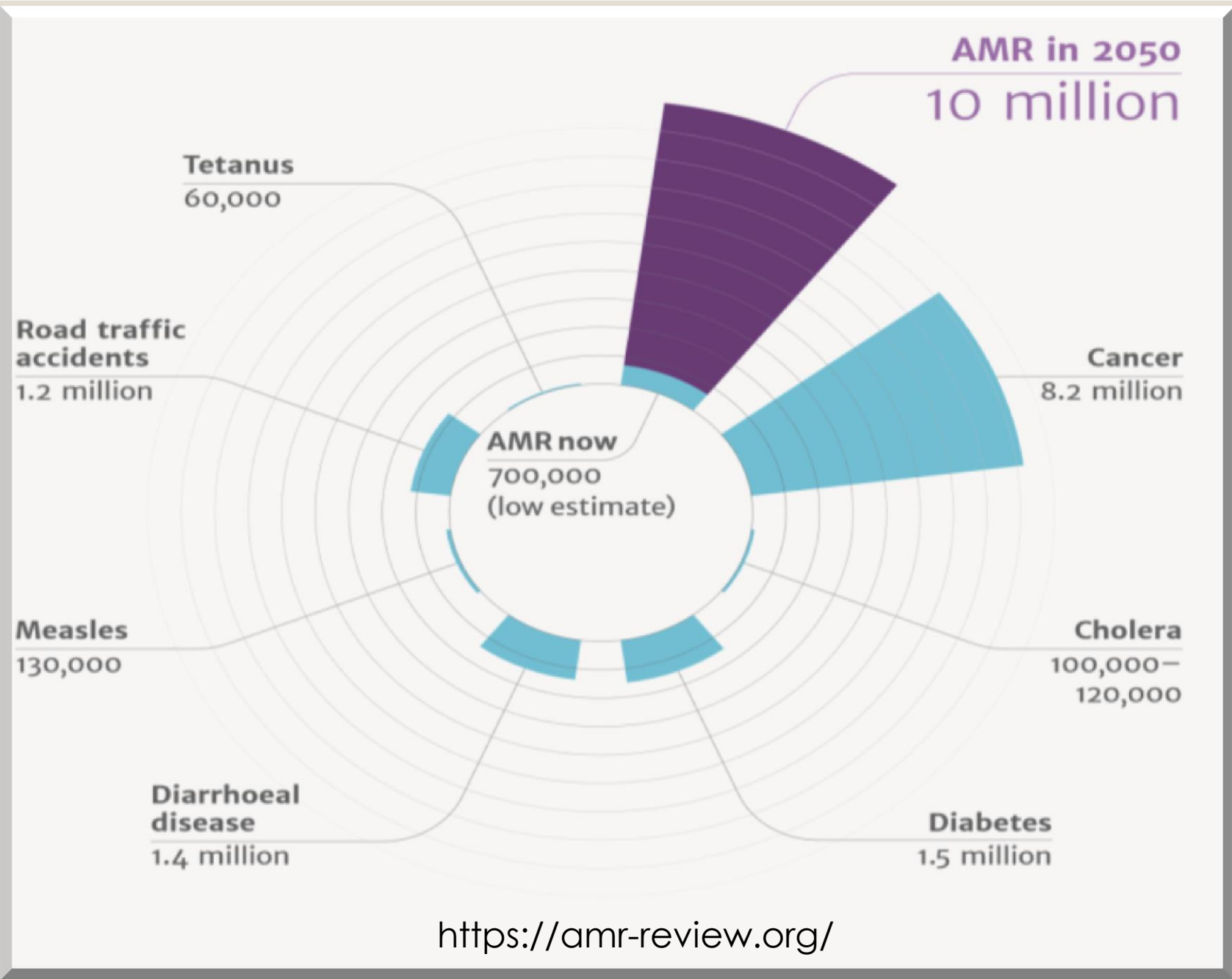
**Maria Cristina Ossiprandi**  
Reggio Emilia 11 ottobre



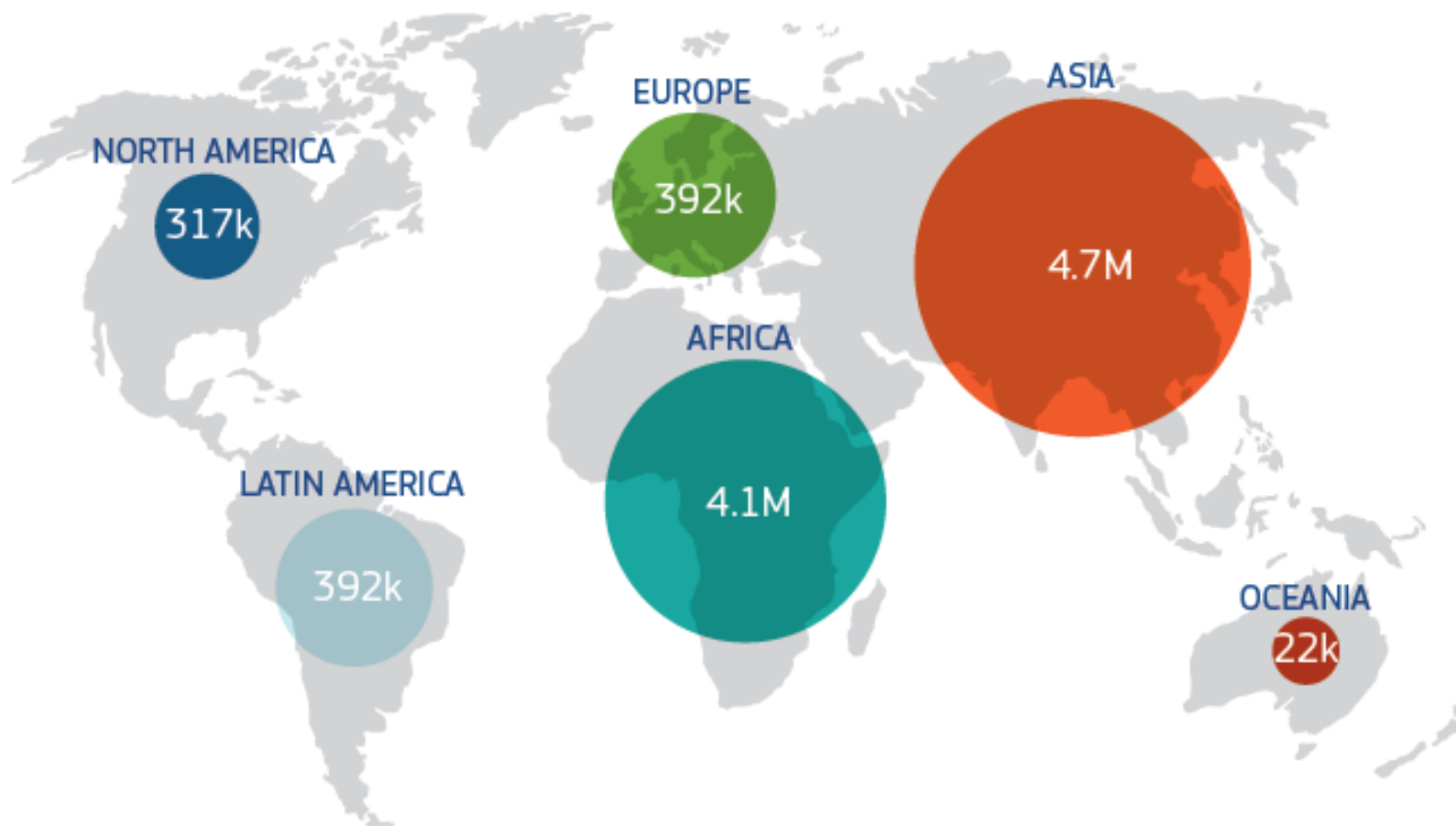
# Paradigma



il problema della resistenza agli antibiotici è globale e multifattoriale e va affrontato con un approccio *One Health*



<https://amr-review.org/>



Number of deaths per year attributable to AMR by 2050 if current resistance rates increased by 40%

L'antibiotico resistenza  
è una parte naturale  
dell'evoluzione



Come l'uomo ha creato molecole per contrastare le malattie pericolose, così i microrganismi evolvono una resistenza ad esse.

La crisi riconducibile all'antibiotico resistenza è una minaccia globale **MAN-MADE**

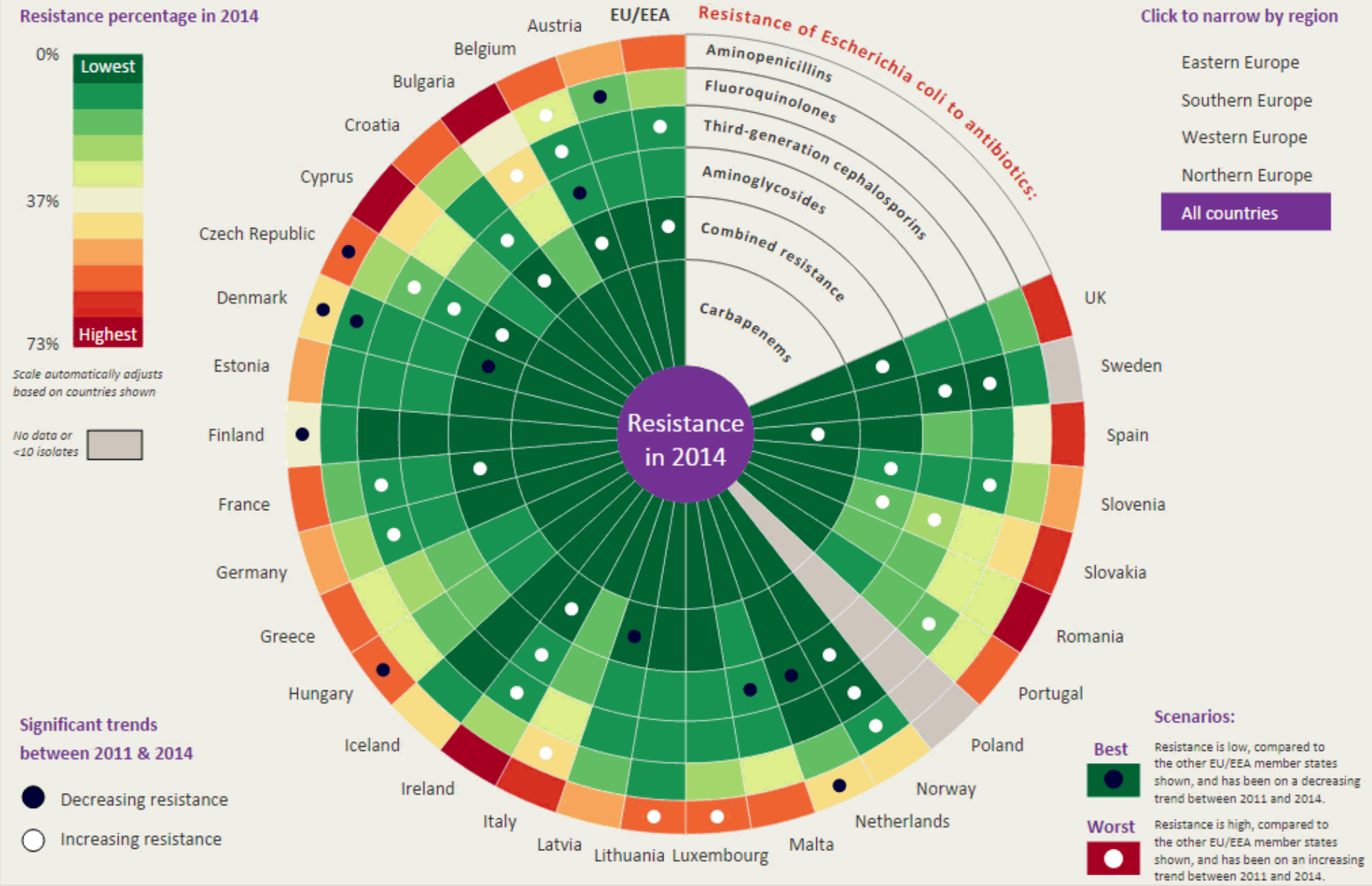


# Strategie (*Global Action*)

The **key objectives** of this new plan are built on three main pillars:



The new plan contains more than 75 **concrete actions with EU added value** that the Commission will develop and strengthen as appropriate in the coming years for a more integrated, comprehensive and effective approach to combating AMR.







# Agenda 2030

## Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale ER



Campagna di sensibilizzazione e divulgazione





UNIVERSITÀ  
DI PARMA

# NOTTE DEI RICERCATORI





# Bckground storico



EUROPEAN  
HEALTH REPORT

# 2018

More than numbers – evidence for all



Ceftiofur (III generazione)  
Cefquinome (III generazione)  
Cefalonium (I generazione)  
Cefoperazone (III generazione)  
Cefovecin (III generazione)  
Cefuroxime (II generazione)

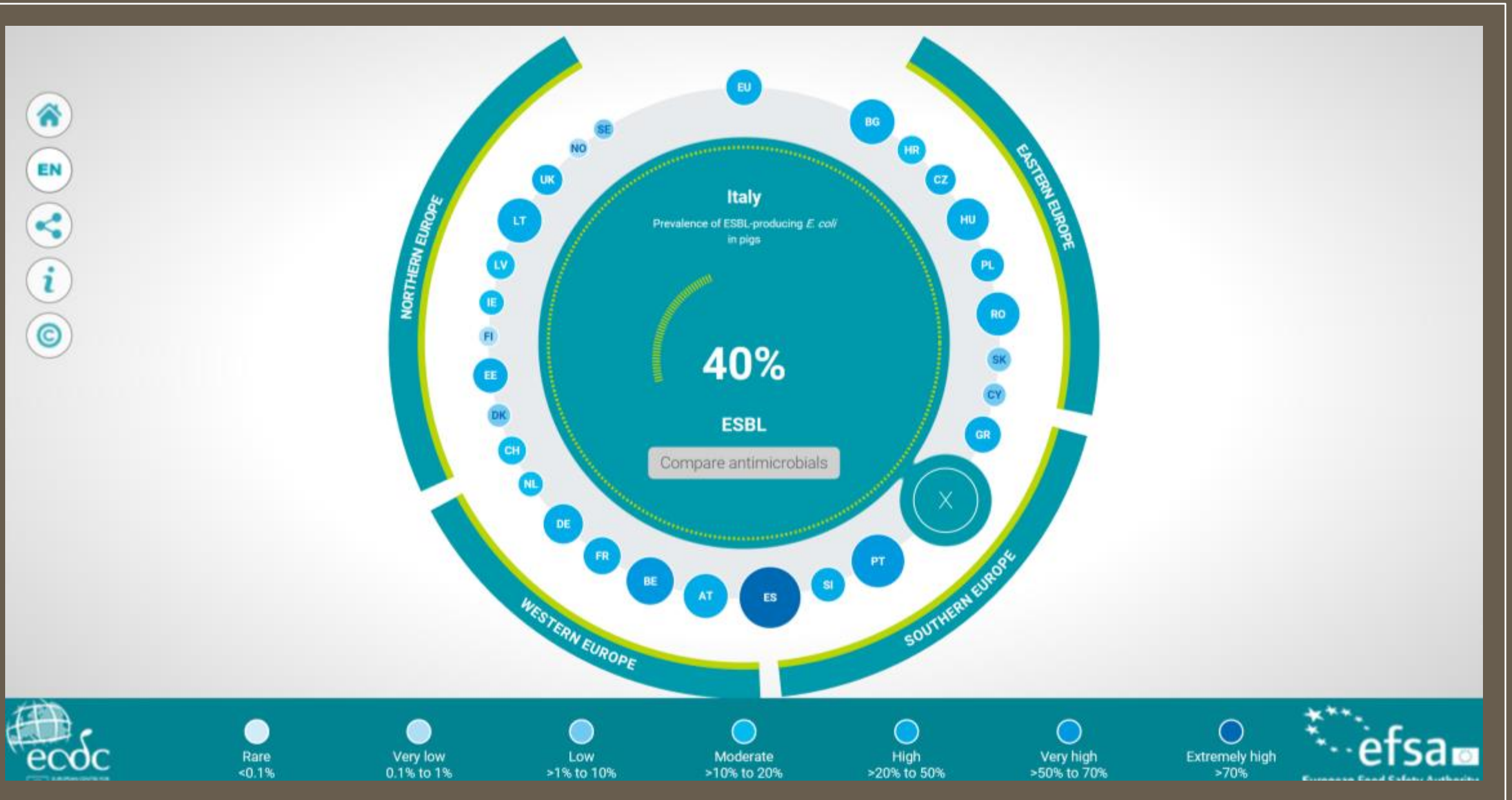
Sono tra le cefalosporine maggiormente utilizzate a livello mondiale in ambito veterinario.

Senza alcun dubbio l'impiego indiscriminato e massivo di queste molecole nel settore zootecnico ha contribuito alla **selezione** ed alla **diffusione** di stipti multiresistenti di *Enterobacteriaceae*

Nell'ultima decade la diffusione di *Enterobacteriaceae* resistenti a cefalosporine di III e IV generazione (ricollegabile alla comparsa di ceppi produttori di beta-lattamasi a spettro esteso **ESBL**, AMPc mediato da plasmidi e/o Carbapenemase) è emerso come un problema globale (EFSA 2011 et 2013)



# Escherichia coli (suino)



La resistenza antimicrobica su base genica nei batteri patogeni è quindi conseguenza della **rapida evoluzione delle sequenze di DNA** che esita in un'enorme variabilità strutturale dei cosiddetti effettori di resistenza (*resistance effectors*).

Modifiche strutturali dei geni di resistenza in seguito a **mutazioni e ricombinazioni**, unitamente ad una moltitudine di eventi differenti che stimolano la loro **mobilità ed espressione**, permettono ai microrganismi di sopravvivere in ambienti saturi di agenti antimicrobici di vario tipo e generazione.

I geni che codificano per beta-lattamasi in batteri gram-negativi sono un esempio affascinante di questa **evoluzione multifocale e multidirezionale**.

Le ESBL corrispondono ad uno delle più **spettacolari 'realizzazioni' di questa strategia evolutiva**.

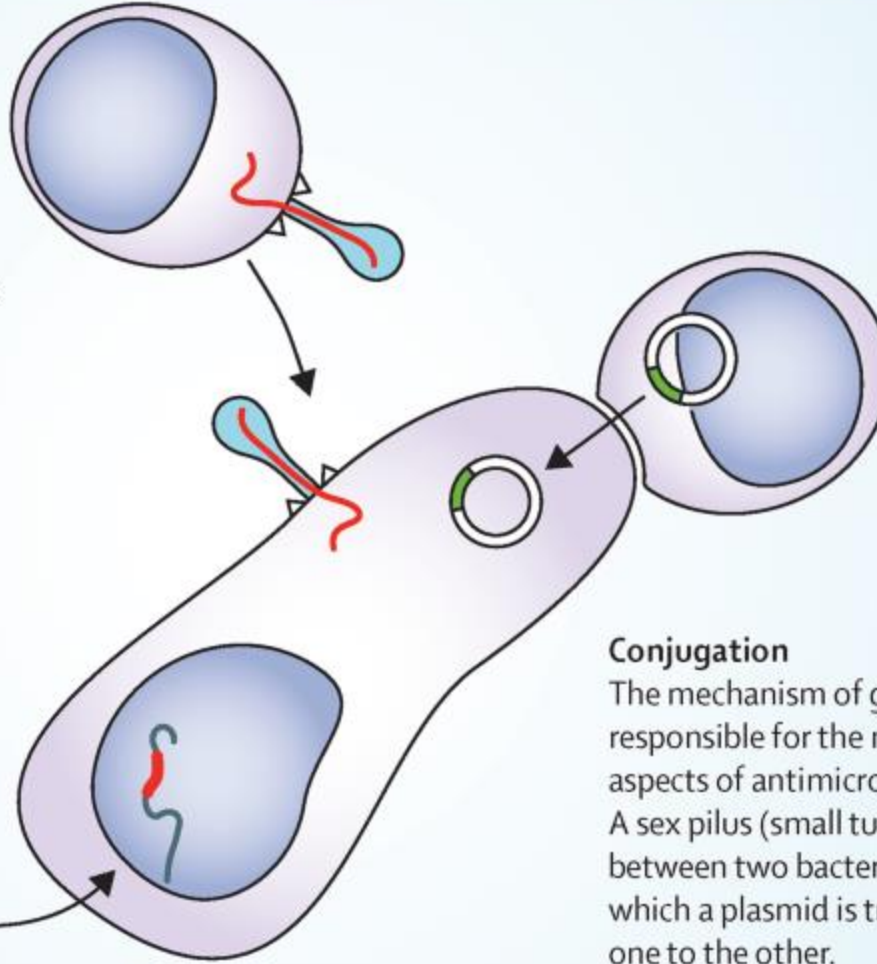
### Transduction

Bacteriophages (viruses that infect bacteria) mediate transfer of DNA between bacteria via transduction, whereby DNA from a donor bacterium is packaged into a virus particle and transferred into a recipient bacterium during infection.



### Transformation

Some bacteria are able to take up free DNA from the environment and incorporate it into their chromosome.



### Conjugation

The mechanism of gene transfer responsible for the most concerning aspects of antimicrobial resistance. A sex pilus (small tube) forms between two bacterial cells through which a plasmid is transferred from one to the other.

La resistenza antimicrobica su base genica nei batteri patogeni è quindi conseguenza della **rapida evoluzione delle sequenze di DNA** che esita in un'enorme variabilità strutturale dei cosiddetti effettori di resistenza.

Modifiche strutturali dei geni di resistenza in seguito a **mutazioni e ricombinazioni**, unitamente ad una moltitudine di eventi differenti che stimolano la loro **mobilità ed espressione**, permettono ai microrganismi di sopravvivere in ambienti saturi di agenti antimicrobici di vario tipo e generazione.

I geni che codificano per beta-lattamasi in batteri gram-negativi sono un esempio affascinante di questa **evoluzione multifocale e multidirezionale**.

Le ESBL corrispondono ad uno delle più **spettacolari 'realizzazioni' di questa strategia evolutiva**.

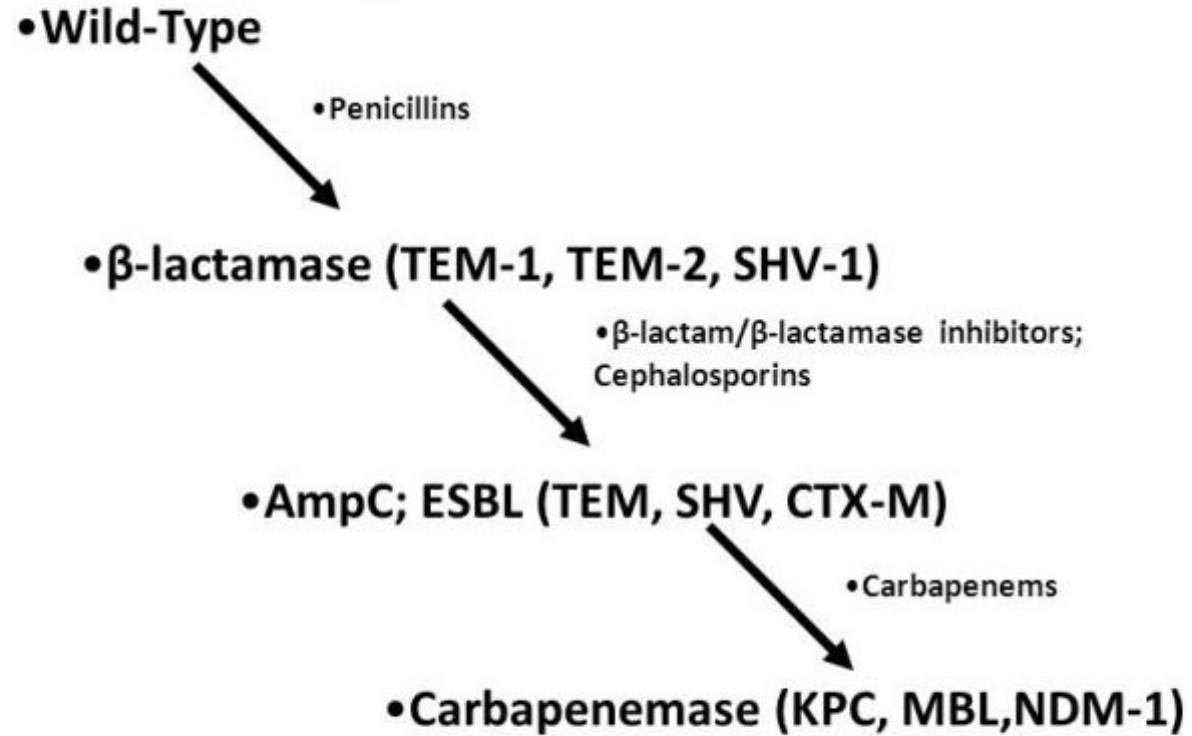
Alcuni delle ESBL note ad oggi sono enzimi '*ready-to-use*' nei loro produttori naturali

Molte ESBL sono state generate in seguito a mutazioni nei geni che codificano per enzimi ad ampio-spettro, e hanno fatto la loro comparsa già a partire dagli anni '60.

Il vero problema corrisponde alla **mobilitazione del gene** codificante ESBL ma anche alla sua **acquisizione** e ad una sua **espressione sufficiente** a garantire un microrganismo più virulento.



# Evolution of $\beta$ -Lactamases

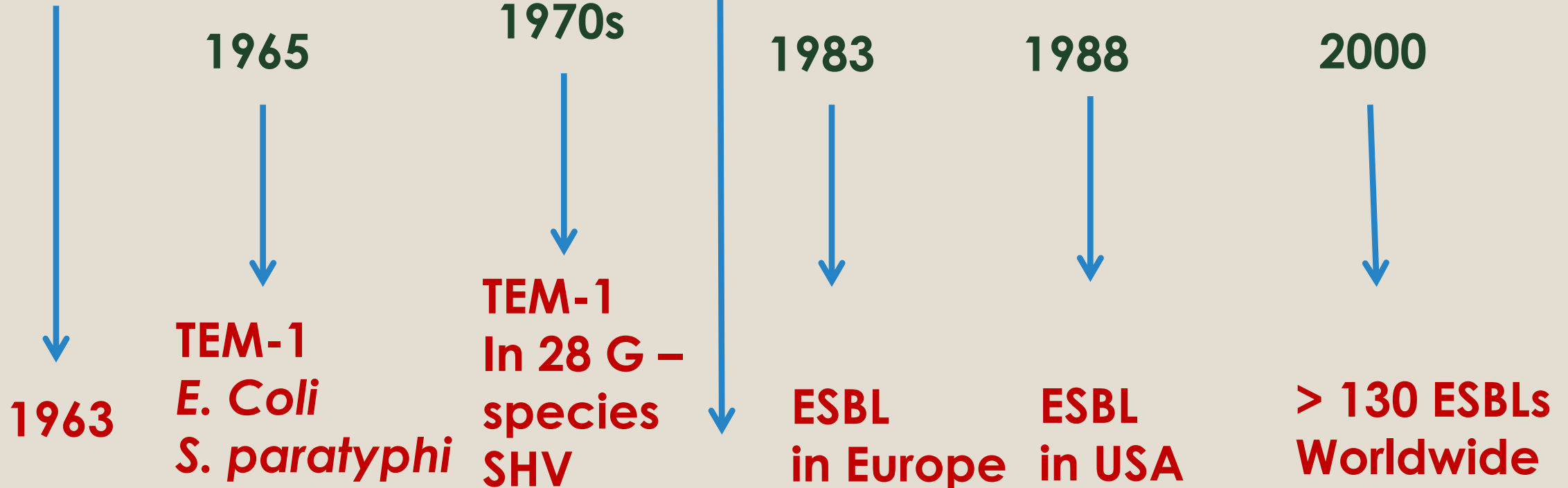


# EVOLUZIONE DELLE BETA-LATTAMASI

## Plasmid-mediated TEM and SHV $\beta$ -lactamases

Cefaslosporine ad ampio spettro

Ampicillina



# Strategia evolutiva

UN ESEMPIO DI EVOLUZIONE VELOCE:  
RESISTENZA MEDIATA DALLE  $\beta$ -LATTAMASI

LE  $\beta$ -LATTAMASI SI POSSONO DIVIDERE IN

PENICILLINASI (A)  
Cloxacillinasi (D)

Penicilline prime cefalosporine

ESBL (A)

Penicilline, cefalosporine, anche in  
combinazione con inibitori

CEFALOSPORINASI AmpC (C)

Penicilline, cefalosporine

CARBAPENEMASI

CLASSE A

Tutti i  $\beta$ -lattamici

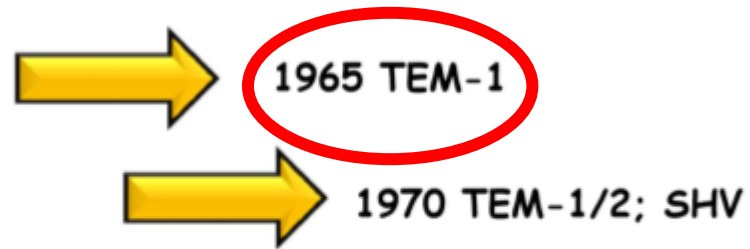
CLASSE B

Tutti i  $\beta$ -lattamici  
tranne i monobattami

CLASSE D

carbapenemi e altri  
 $\beta$ -lattamici

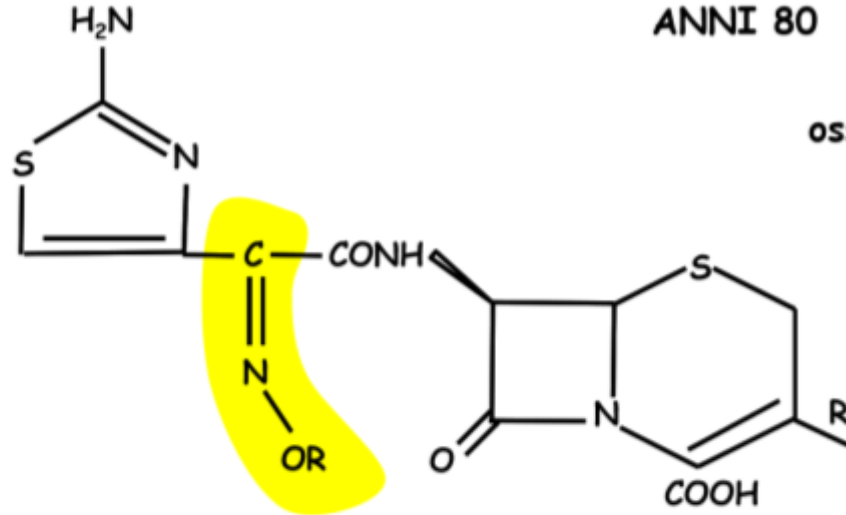
1963 introduzione dell'ampicillina



Beta-lattamasi di classe A (sito attivo a serina) plasmidiche

TEM (90% dei fenotipi  
Amp<sup>R</sup> in *E. coli*)

SHV trovate originariamente in  
*Klebsiella* (68% omologia con TEM)



Cefotaxime  
Ceftriaxone  
Ceftazidime

antibiotici più usati per trattare UTI, polmoniti, infezioni intra-addominali complicate, setticemie

abuso di cefalosporine-ES

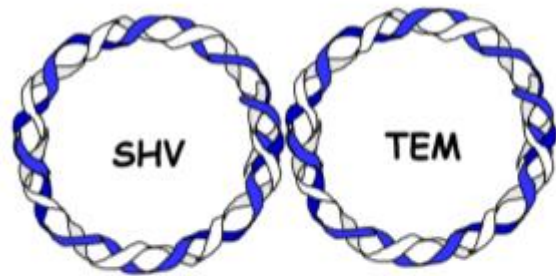


Pressione selettiva



Comparsa di ESBL





NON attive sulle cefalosporine-ES

MUTAZIONE

Extended Spectrum  
Beta Lactamases  
(ESBL)

Plasmidiche, trasferibili per TGO  
Largamente diffuse

Importanza clinica/epidemiologica in:

Enterobacteriaceae:

*K. pneumoniae*

*E. coli*

*P. mirabilis*

altri

A differenza delle forme Wild Type le ESBL idrolizzano Cefalosporine di III generazione e Aztreonam (monobattami)

Gram-negativi non fermentanti

*P. aeruginosa*

• *Acinetobacter*

TGO: trasferimento di geni orizzontale o trasferimento genico orizzontale

ANNI '90

Comparsa di nuove  $\beta$ -lattamasi  
Diverse da TEM e SHV anche se simili

le più importanti:  
**CTX-M**

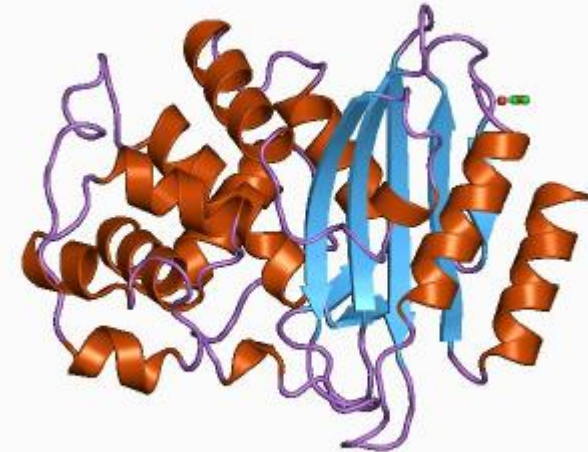
Questi enzimi non derivano  
da mutazioni

sono stati acquisiti dal metagenoma  
ambientale attraverso meccanismi di TGO

Diffusione ESBL

Anni '90  
soprattutto in *Klebsiella*  
Infezioni nosocomiali  
TEM & SHV

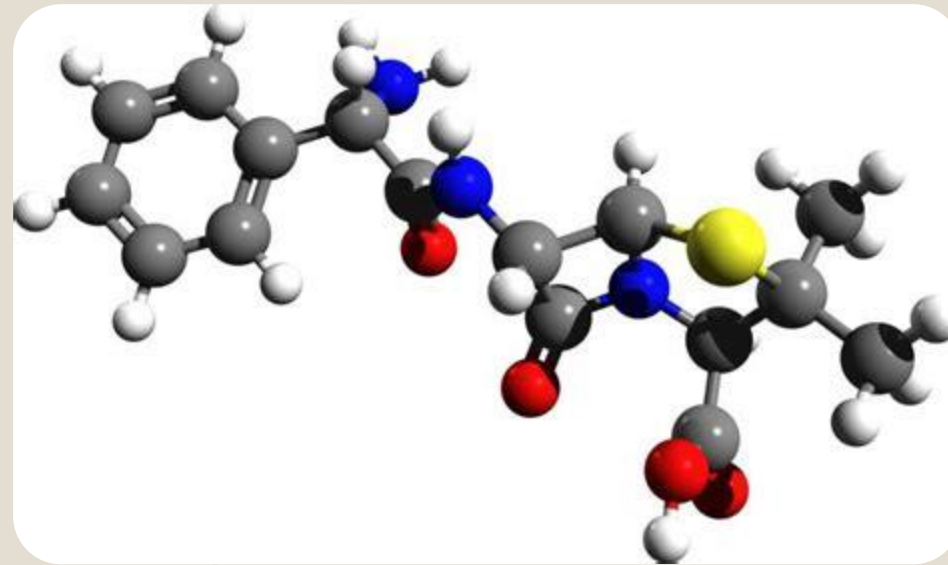
Anni 2000 globalizzazione:  
Maggiore incidenza  
Specie diverse (*Klebsiella*, *E. coli*, *P. mirabilis*..)  
Ospedali, lungo-degenze, comunità..  
CTXM  
TEM & SHV



geni d'origine che hanno subito mutazioni che conferiscono all'enzima la capacità di idrolizzare le oximino-cefalosporine. I geni si trovano su plasmidi e sono designati dalle sigle **blaTEM**, **blaSHV**, **blaOXA**;

$\beta$ -lattamasi simili alle precedenti ma derivanti da altri geni. Designati **blaCTX-M** e **blaVEB**, possono anch'essi trovarsi su plasmidi che spesso trasportano geni di resistenza anche per altri antibiotici;

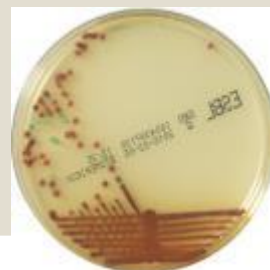
**enzimi AmpC** plasmidici. Questi enzimi sono derivati da geni presenti sul cromosoma di molti batteri. Conferiscono una resistenza ai  $\beta$ -lattamici molto estesa.

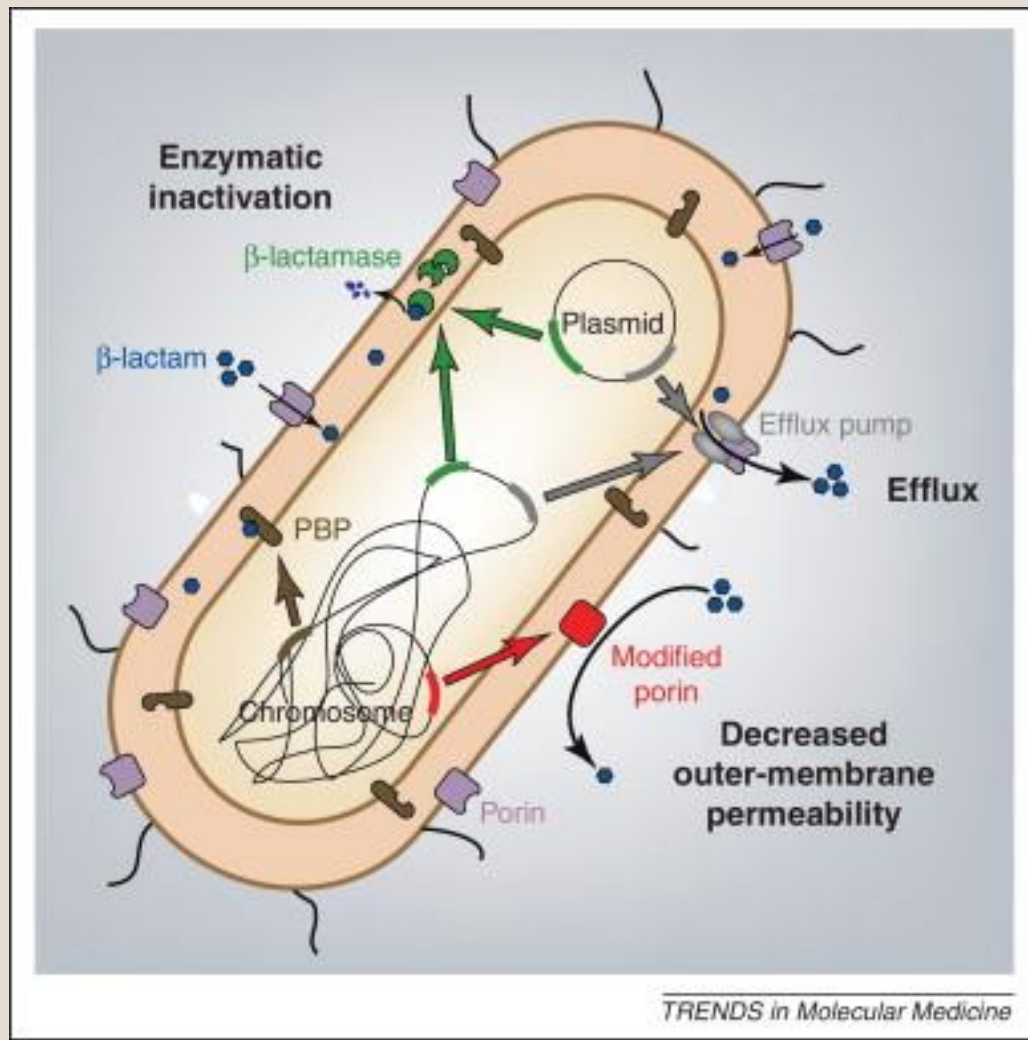


I meccanismi di resistenza ai  $\beta$ -lattamici sono molteplici e, a seconda delle caratteristiche del batterio e del bersaglio del  $\beta$ -lattamico, si registreranno effetti dell'antibiotico differenti.

Sono stati scoperti i vari meccanismi di resistenza ai  $\beta$ -lattamici che sono:

- la diminuzione dell'assorbimento dell'antibiotico a livello citoplasmatico dato dalla mutazione delle proteine di membrana che riducono il grado di penetrazione del beta-lattamico all'interno della cellula;
- l'alterazione del bersaglio dell'antibiotico causato dalle alterazioni delle proteine quali le PBPs (*Penicillin-binding proteins*) che portano ad una minore affinità tra il recettore e l'antibiotico;
- la produzione di enzimi capaci di degradare o alterare l'anello  $\beta$ -lattamico

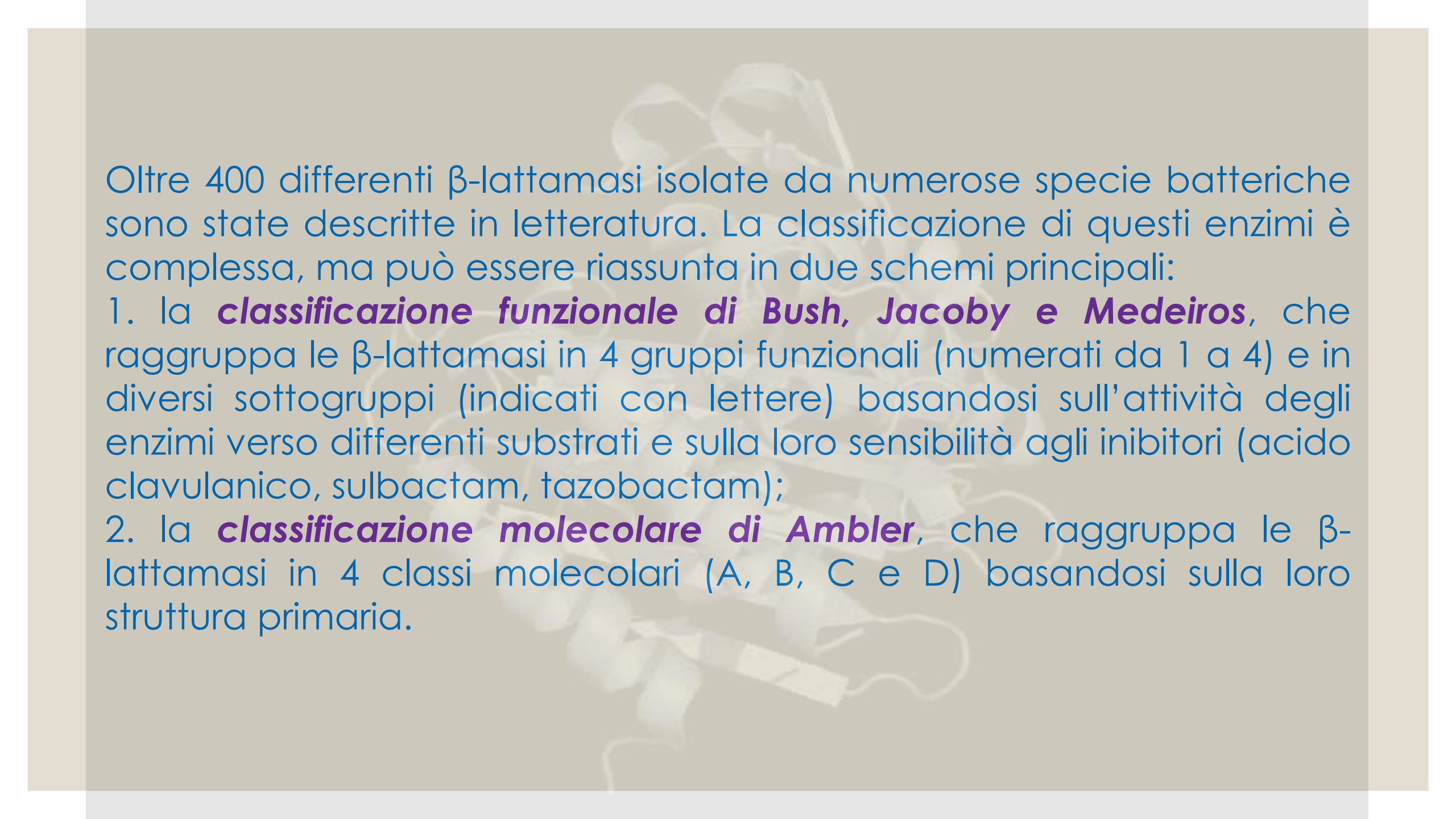




Non esiste una definizione universalmente condivisa di ESBL.

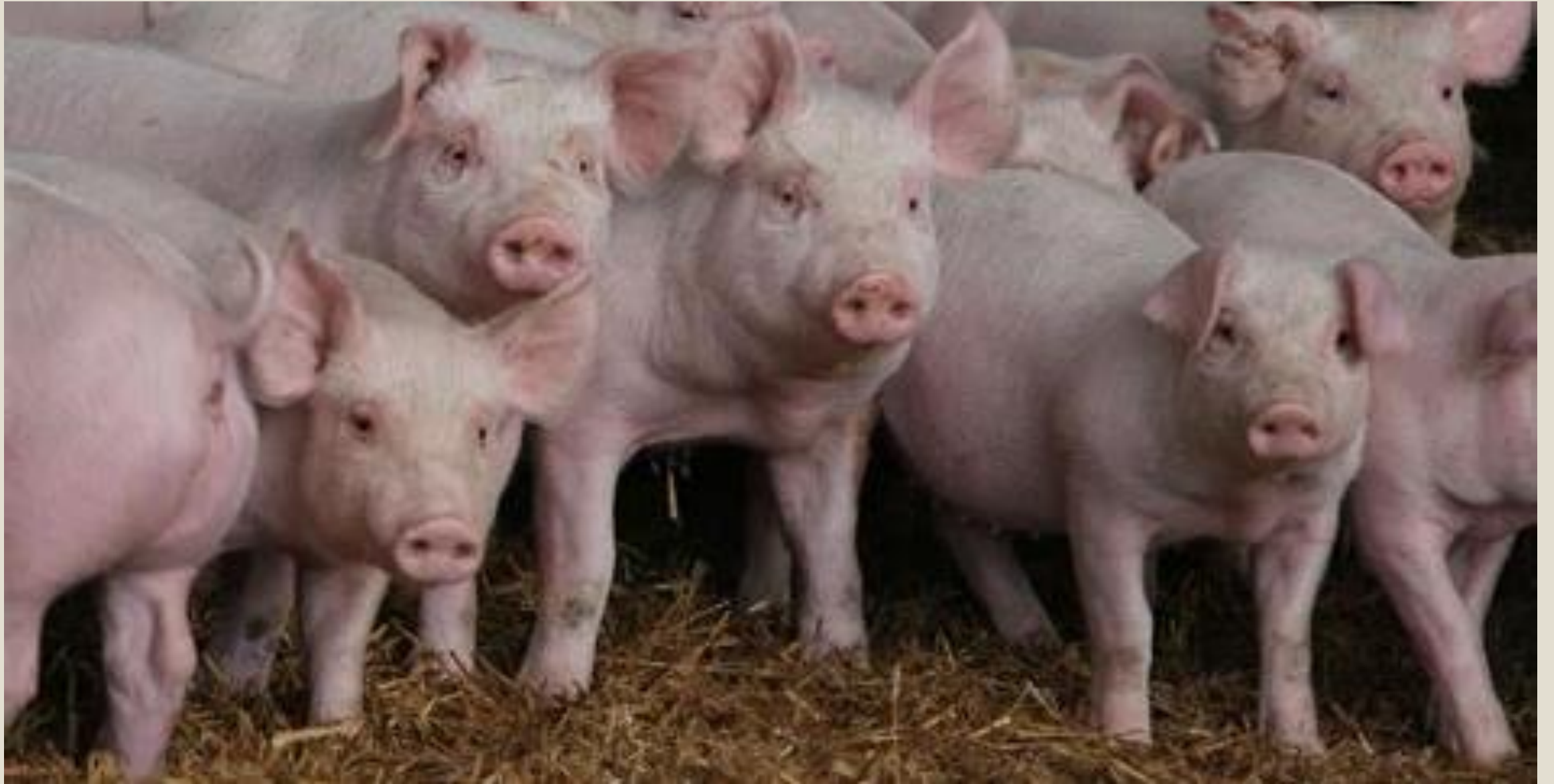
Classicamente, tuttavia, questo termine è stato riservato agli enzimi di classe molecolare A che sono capaci di idrolizzare le ossimino-cefalosporine e i monobattami e che, a differenza delle β-lattamasi di tipo AmpC, vengono inibiti in vitro dall'acido clavulanico e da altri inibitori delle β-lattamasi (sulbactam,tazobactam). Le ESBL così definite non idrolizzano i carbapenemi né (a differenza delle β-lattamasi di tipo AmpC) le cefamicine. Rispetto alle AmpC, **le ESBL si differenziano anche per una attività spesso elevata nei confronti delle cefalosporine di quarta generazione quali cefepime e cefpirome.**





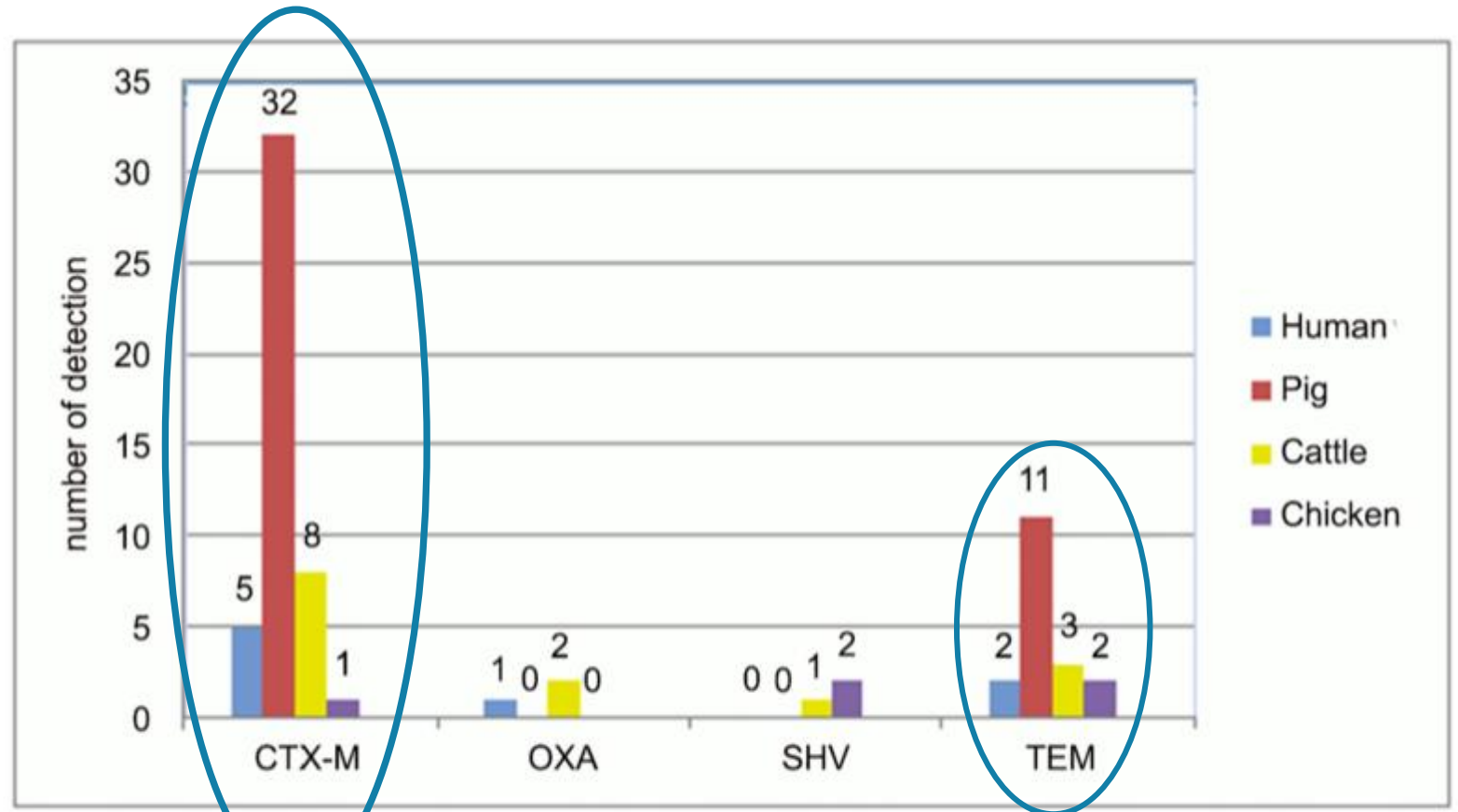
Oltre 400 differenti  $\beta$ -lattamasi isolate da numerose specie batteriche sono state descritte in letteratura. La classificazione di questi enzimi è complessa, ma può essere riassunta in due schemi principali:

1. la **classificazione funzionale di Bush, Jacoby e Medeiros**, che raggruppa le  $\beta$ -lattamasi in 4 gruppi funzionali (numerati da 1 a 4) e in diversi sottogruppi (indicati con lettere) basandosi sull'attività degli enzimi verso differenti substrati e sulla loro sensibilità agli inibitori (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam);
2. la **classificazione molecolare di Ambler**, che raggruppa le  $\beta$ -lattamasi in 4 classi molecolari (A, B, C e D) basandosi sulla loro struttura primaria.





# Distribuzione ESBL in differenti specie uomo incluso



**Fig 2. Distribution of ESBL genes in samples of human, pig, cattle and chicken origin.** The figure shows the distribution of the ESBL genes CTX-M, OXA, SHV and TEM of *Escherichia* spp. isolates from humans (inguinal swabs), pig and cattle (fecal samples) and broiler (boot swabs). CTX-M ESBL dominated in pigs with 32 isolates; 8 were found in cattle, 5 in humans and 1 in poultry. OXA enzymes were rare, but most frequently isolated from cattle (n = 2). SHV were also rare and dominated in poultry (n = 2). TEM were most frequently found in isolates of pig origin (n = 11).

**Table 1 Occurrence of ESBL producers in food-producing animals at slaughter as well as in minced meat, bulk tank milk and isolates from bovine mastitis in Switzerland**

Origin	n	Number of samples with ESBL producers (percentage)
Cattle, fecal samples	124	17 (13.7%; [95% CI, 8.1; 21.0])
calves	63	16 (25.3%; [95% CI, 15.3; 37.9])
others	61	1 (1.6%; [95% CI, 0.4; 8.7])
Pig, fecal samples	59	9 (15.3%; [95% CI, 7.2; 26.9])
Chicken, fecal samples from crates of different flocks	93	59 (63.4%; [95% CI, 52.8; 73.2])
Sheep, fecal samples	58	5 (8.6%; [95% CI, 2.9; 18.9])
lambs	40	2 (5.0%; [95% CI, 0.6; 16.9])
others	18	3 (16.7%; [95% CI, 3.5; 41.4])
Mined meat (pork, beef)	104	0 (0.0%; [95% CI, 0.0; 3.4])
Bulk tank milk	100	0 (0.0%; [95% CI, 0.0; 3.6])
<i>E. coli</i> isolates from mastitis milk	67	1 (1.5%; [95% CI, 0.3; 8.0])

n: number of samples tested

CI: confidence interval

**Table 2 Identification and further characterization of the 91 ESBL producers isolated from 334 healthy food-producing animals at slaughter and from 67 *Escherichia coli* mastitis milk samples in Switzerland**

Sample number	Origin	Species	Expressed ESBL & accompanying $\beta$ -lactamase	$\beta$ -lactam antibiotic resistances											Additional resistance
				AM	AMC	CF	CXM	CPD	CTX	CAZ	FEP	FOX	IPM		
13	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1	r	s	r	r	r	i <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	ss	s	NA, S, SXT, TE	
14	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1	r	s	r	r	r	i <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	i <sup>a</sup>	s	s	NA, TE	
64	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1	r	s	r	r	r	r	s <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s	s	SXT	
65	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1	r	s	r	r	r	i <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s	s	NA, TE	
17	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1 & TEM-1	r	s	r	r	r	r	s <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s	s	CIP, NA, S, TE	
18	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1 & TEM-1	r	s	r	r	r	r	s <sup>a</sup>	i <sup>a</sup>	s	s	C, CIP, NA, S, SXT, TE	
72	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1 & TEM-1	r	s	r	r	r	i <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s	s	S, SXT	
60	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-1 & TEM-186	r	s	r	r	r	i <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s	s	S, SXT	
16	pig	<i>E. coli</i>	CTX-M-14 & TEM-1	r	s	r	r	r	r	s <sup>a</sup>	s <sup>a</sup>	s	s	CIP, GM, NA, S, SXT, TE	

## Una fotografia della situazione epidemiologica

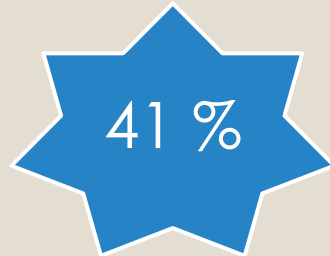
Phenotypically ESBL-producing isolates (n = 99) were tested for CTX-M, OXA, SHV and TEM using PCR, and isolates were further characterized using multilocus sequence typing (MLST). In total, 61 diverse isolates from different sources and/ or different MLST/PCR results were acquired. Five farm workers (three from cattle farms and two from pig farms) harbored ESBL-producing *E. coli*. All human isolates harbored the CTX-M  $\beta$ -lactamase; TEM and OXA  $\beta$ -lactamases were additionally detected in two, resp. one, isolates. ESBL-producing *Escherichia* spp. were found in fecal samples at pig (15/17), cattle (6/11) and poultry farms (3/6). In total, 70.6% (24/36) of the tested farms were ESBL positive. Furthermore, 9 out of 60 cloacal swabs turned out to be ESBL positive. All isolated ESBL-producing bacteria from animal sources were *E. coli*, except for one *E. hermannii* isolate. **CTX-M was the most prevalent**  $\beta$ -lactamase at cattle and pig farms, while SHV predominated in poultry.

It has been investigated the presence of ESBL and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in **200 rectal swabs** of healthy swine and in **200** samples of **ground pork**.

Phenotypic testing by using the double synergy differential test (DSDT) for ESBL/AmpC-positive strains was confirmed by PCR and DNA sequence analysis.

This study found ESBL and/or AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in **52.2%** (95/182) isolates collected from rectal swabs and 3% (3/100) of isolates obtained from ground pork samples. Considering the swine isolates, the result showed that ***E. coli* was the prevalent ESBL producer** and **TEM-52 was the most common detected TEM-type ESBL**.

On the other hand, **no ESBL-producing *Enterobacteriaceae* were found in ground pork**; only AmpC-type  $\beta$ -lactamase was found in three meat samples.



41 %

**TABLE 1.** PHENOTYPE AND GENOTYPE OF ESBL/AMPC B-LACTAMASES PRODUCERS ISOLATED FROM RECTAL SWABS AND GROUND PORK

N° of isolates	Genotypes	SYN-CLA	SYN-BA
Rectal swabs (182)	ESBL (82) (45,1)	82 (100)	
	AmpC (13) (7,1)		13 (100)
Ground pork (100)	AmpC (3) (3)		3 (100)

ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; SYN-CLA, synergy with clavulanic acid; SYN-BOR, synergy with boronic acid.

**TABLE 2.** GENOTYPE OF THE STRAINS PRODUCING ESBL AND AMPC-TYPE B-LACTAMASES, ISOLATED FROM RECTAL SWABS AND GROUND PORK

Species	Source	Genotypes	
		ESBL <sub>s</sub>	AmpC
<i>E. coli</i>	Rectal swabs	TEM-1+SHV-12 (1)	TEM-1+CMY-2 (4)
		TEM-20 (4)	CMY-2 (5)
		TEM-20+SHV-12 (2)	
		TEM-34 (16)	
		TEM-52 (48)	
<i>C. freundii</i>	Rectal swabs	CTX-M-1 (5)	
		CTX-M-1 (4)	TEM-1+CMY-2 (3) CMY-2 (1)
<i>K. ozaenae</i>	Rectal swabs	TEM-20 (1)	
<i>E. cloacae</i>	Ground pork	TEM-34 (1)	ACC-1 (1)
<i>Salmonella subsp. arizoane</i>	Ground pork		ACC-1 (1)
<i>Serratia liquefaciens</i>	Ground pork		ACC-2 (1)











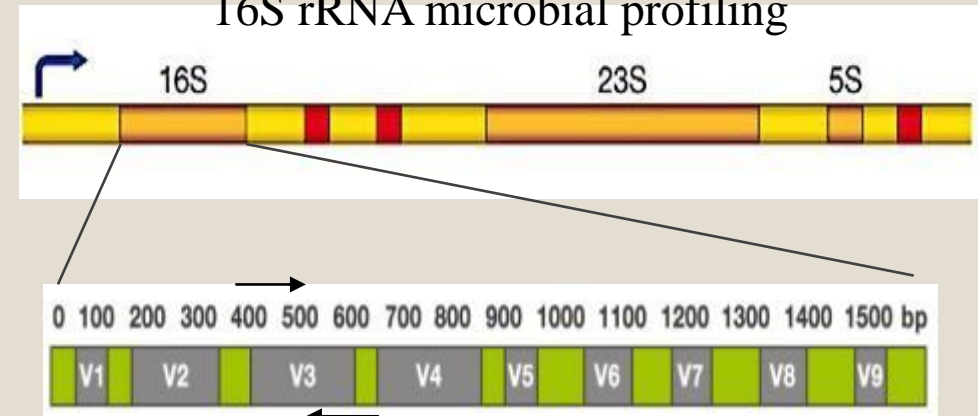
# Accessing the composition of microbial community

## Culturomic approach



Isolation and characterization of a reduced portion of the bacterial gut community

## 16S rRNA microbial profiling



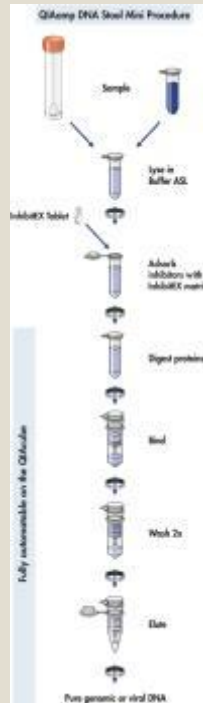
## Metagenomic approach



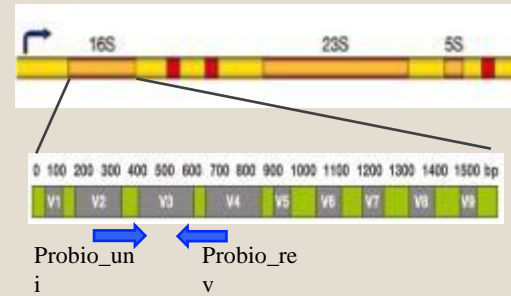
Investigation of biodiversity and complexity of gut microbiota through Next-Generation Sequencing techniques

# Workflow

**Sampling**  
**DNA Extraction**  
(QIAamp DNA Stool  
Mini Kit)



**PCR Amplification**



**Library Preparation  
And Quantification**



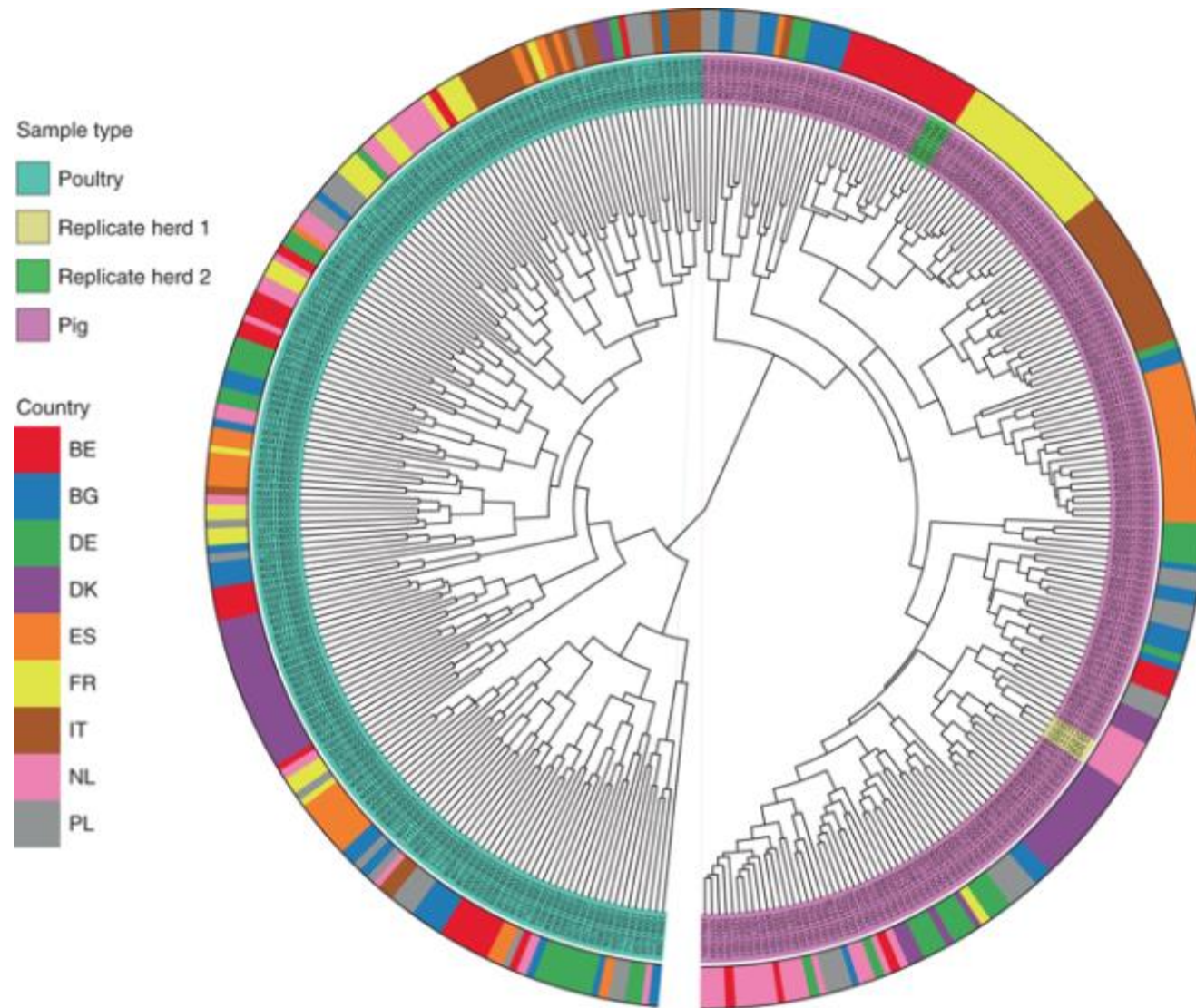
**Illumina MiSeq  
Sequencing**



**Bioinformatic  
analysis**



# Resistome clustering is influenced by both host animal and country

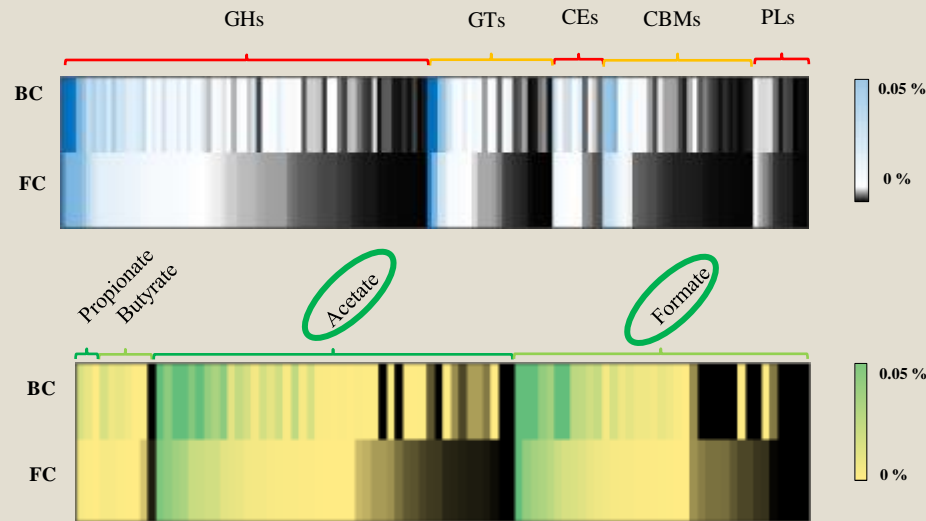




# Prediction of the cecal microbiomes of poultry

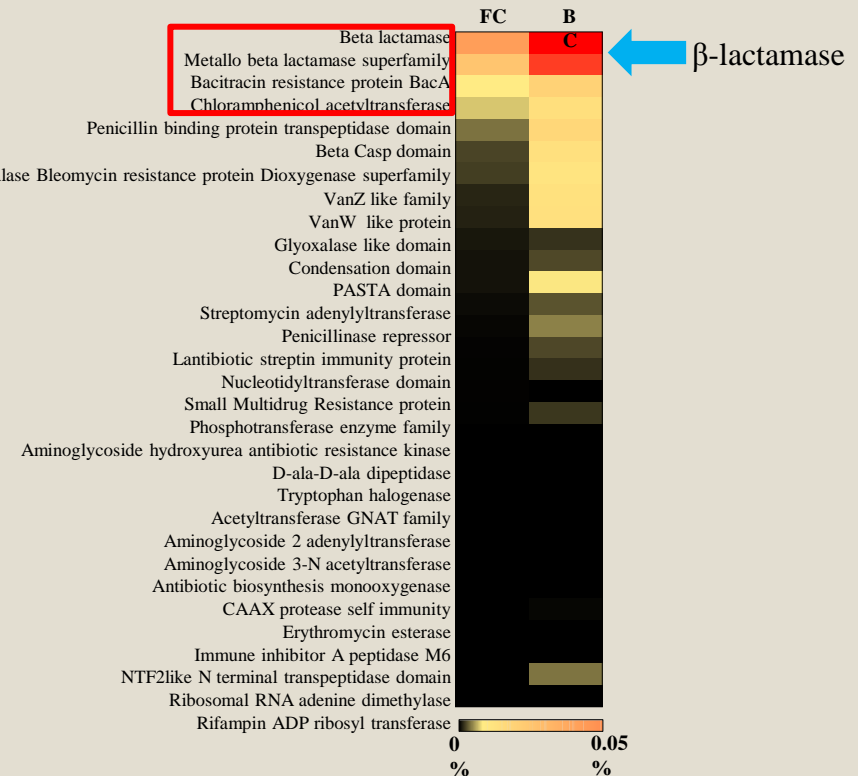
3 FC vs. 3 BC

Functional characterization of chicken cecal microbiome



Farm animals have undergone a genetic selection to reach maximum increase in body weight in a short time and a concurrent maximal conversion of diet into body weight. Lower prevalence of these genes can be considered as a selective advantage for balancing body size and mobility

Prediction of the resistome



Feralization with accompanying detachment from human care is correlated with the reduction of ARGs in the FC microbiome

Grazie della vostra attenzione



[mariacristina.ossiprandi@unipr.it](mailto:mariacristina.ossiprandi@unipr.it)