



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Antibiotico-resistenza:
un approccio One Health**

Relatore: Chiar.ma
**Prof.ssa Pamela
Barbadoro**

Tesi di Laurea di:
Samuele Marasca

Correlatore:
Dott.ssa Elisa Ponzio

A.A. 2019/2020

INDICE

INTRODUZIONE	1
1 One Health	1
2 Antibiotico resistenza	3
2.1 Definizione	3
2.2 Meccanismi biochimici di resistenza	3
3 Trasferimento genico orizzontale	7
3.1 Plasmidi	9
3.2 Trasposoni	10
4 <i>Escherichia Coli</i>	11
4.1 Principali patologie determinate dagli <i>E. coli</i>	11
4.2 Epidemiologia dei pattern di resistenza negli <i>E. coli</i>	14
5 Sviluppo e diffusione dell'antibiotico resistenza	18
5.1 Ruolo dell'uso antibiotico nell'uomo e negli animali	18
5.2 Ruolo del contatto diretto ed indiretto	24
5.3 Ruolo della catena alimentare	25
5.4 Ruolo dei viaggi internazionali	28
5.5 Ruolo dell'ambiente.	30
6 Rilevanza clinica dell'antibiotico resistenza nelle infezioni umane	33
OBIETTIVO DELLO STUDIO	36
METODOLOGIA.....	37
Analisi dell'antibiotico-resistenza.....	37
Analisi fenotipica	37
Analisi molecolare.....	39
Analisi Epidemiologica	42

RISULTATI	44
Analisi microbiologica.....	44
Analisi epidemiologica.....	48
DISCUSSIONE.....	50
CONCLUSIONI	53
BIBLIOGRAFIA	54

INTRODUZIONE

1 One Health

La tutela e la preservazione della salute umana, in tutte le sue forme, non può considerarsi svincolata da quella che è la salute degli animali e più in generale dell'ecosistema.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce One Health come: “un approccio basato sulla progettazione e attuazione di programmi, politiche e norme con il fine di raggiungere migliori risultati nel settore della salute pubblica mediante l'interazione tra molteplici ambiti scientifici” [1]. Numerosi infatti dovrebbero essere i gruppi professionali coinvolti tra i quali medici e veterinari di sanità pubblica, epidemiologi, biologi, ecologi, botanici e zoologi, ed altre figure professionali come gli economisti ed i sociologi [2].

Questa modalità d'intervento, che mira a “preservare l'integrità degli ecosistemi, a beneficio dell'uomo, degli animali domestici e della biodiversità” [3] deve essere adoperata a tutti i livelli, da quello locale a quello regionale, fino ai livelli nazionali ed internazionali [1]. Naturalmente, per poter agire su più vasta scala ed in maniera organizzata e strutturata, è necessario il coinvolgimento e l'intervento di politici, legislatori, ministri e delle organizzazioni internazionali [1,2]. Solo con un approccio sinergico fra le varie nazioni ed agendo su più fronti si potranno garantire e ottenere dei reali risultati. Proprio per questo l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha iniziato a lavorare a stretto contatto con l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) e con l'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale [1] e sono inoltre nate organizzazioni specifiche quali la One Health Platform, la One Health Commission e la One Health Initiative.

L'approccio One Health è impiegato in numerosi ambiti, tra i quali quello della sicurezza alimentare e della gestione delle zoonosi, laddove il 75% delle malattie infettive emergenti che interessano gli esseri umani sono di origine animale e circa il 60% di tutti i patogeni che colpiscono l'uomo sono zoonotici [4].

Nell'ottica non solo della One Health, ma anche di One World, lo scopo prioritario è quello di ridurre la diffusione del problema dell'antibiotico resistenza. Infatti, un mondo sempre più globalizzato e interconnesso, nel quale si può osservare quotidianamente lo spostamento internazionale ed intercontinentale degli uomini a fini lavorativi o turistici, insieme al trasporto di animali, merci, alimenti e prodotti di qualsiasi natura, faciliterà anche la diffusione ed il trasporto di geni di antibiotico-resistenza [5].

La storia di approccio globale di questa metodologia è recente, e nonostante alcuni congressi mondiali precedenti come il Southern and East African Experts Panel on Designing Successful Conservation and Development Interventions at the Wildlife/Livestock Interface: Implications for Wildlife, Livestock, and Human Health tenutosi a Durban, in Sud Africa nel 2003, il meeting considerato spesso la prima pietra miliare è il “ One World, One Health: Building Interdisciplinary Bridges to Health in a Globalized World” tenutosi il 29 settembre del 2004, organizzato dalla Wildlife Conservation Society (WCS) e ospitato dalla Rockefeller University, a New York, dove sono stati formulati i 12 principi su “One World, One Health” chiamati anche i 12 principi di Manhattan [3,6,7,8,9,10].

2 Antibiotico resistenza

2.1 Definizione

Nel parlare di antibiotico resistenza, la prima distinzione fondamentale da fare è fra resistenza intrinseca e acquisita.

Resistenza intrinseca o naturale è quella condizione in cui, in base alle caratteristiche proprie di quella specie batterica, un determinato farmaco antibatterico è inefficace [11].

Un esempio di resistenza intrinseca è quella dei gram negativi, impermeabili ai glicopeptidi grazie alla loro membrana esterna [12].

Definiamo invece resistenza acquisita la condizione in cui un ceppo batterico “è in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni del farmaco inibitorie per la massima parte degli stipi della stessa specie, o operativamente, quando uno stipe batterico sia in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni del farmaco pari a quelle massime raggiungibili nel corso dell’impiego terapeutico” [11].

La resistenza acquisita si può verificare attraverso diversi meccanismi e può essere distinta in cromosomica, dovuta a mutazioni o eventi di ricombinazione dei suoi geni housekeeping, o plasmidica, ottenuta grazie alla possibilità dei batteri di effettuare trasferimenti orizzontali di materiale genetico extracromosomico [11,12].

2.2 Meccanismi biochimici di resistenza

I meccanismi biochimici di resistenza possono essere suddivisi in 4 gruppi principali, e ciascuno di essi è dipendente da uno o più determinanti genetici di resistenza.

L’obiettivo finale comune è quello di impedire l’interazione fra il farmaco ed il bersaglio molecolare [12].

Il primo gruppo corrisponde alla modificazione molecolare del bersaglio del farmaco, tale da ridurre l'affinità di legame. Può derivare da:

- mutazioni, come si osserva nella resistenza ai chinoloni successiva ad una modifica della DNA topoisomerasi 2 [12];
- eventi di ricombinazione, in seguito a fenomeni di trasformazione, che portano alla creazione di geni codificanti PBP (penicillin binding protein) con scarsa affinità ai beta-lattamici, fenomeno riscontrabile soprattutto nello *Streptococcus pneumoniae* [12];
- modificazioni strutturali post-trascrizionali quali la metilazione, ad opera di un enzima codificato dal gene ermA, dell'RNA ribosomiale 23S dando luogo ad una resistenza crociata tra tutti i macrolidi, lincosamidi e streptogramine B (fenotipo MLSb) o la metilazione dell'RNA ribosomiale 16S ad opera di metilasi specifiche codificate dai geni rmt e arm, che conferisce resistenza agli aminoglicosidi [12,13];
- sintesi di proteine, quali i fattori di protezione Tet e Qnr, che proteggono rispettivamente i ribosomi dall'azione delle tetracicline e le DNA topoisomerasi dall'azione dei chinoloni legandosi al target molecolare e proteggendolo dall'interazione con l'antibiotico [12];
- acquisizione di geni codificanti enzimi in grado di modificare il bersaglio, come si osserva nella resistenza ai glicopeptidi, diffusa negli enterococchi, dove un cluster di geni "van" porta alla sintesi di precursori del peptidoglicano in cui il pentapeptide, fondamentale per la costituzione dei legami crociati e quindi della stabilità della parete, non sarà più costituito, nella parte terminale, da dimeri di D-alanina ma da dimeri solitamente di D-ala-D-lattato [12];
- acquisizione di geni codificanti enzimi che svolgono la stessa funzione dei target antibiotici, ma che al contrario di questi sono insensibili all'inibizione. In questo

caso più che una modifica abbiamo un vero e proprio vicariamento del bersaglio. Esempi sono l'acquisizione dei geni sul o dfr che codificano la diidropteroato-sintetasi (DHPS) e la diidrofolato reduttasi (DHFR) portando allo sviluppo di resistenza contro i sulfamidici ed il trimetoprim, o l'acquisizione del gene mecA che codifica una penicillin binding protein chiamata PBP2A insensibile a tutte le betalattamine ad eccezione di 2 cefalosporine di 5° generazione, rendendo di fatto inefficace un'intera famiglia di antibiotici. Il microrganismo principalmente interessato da questa resistenza mediata dalla PBP2A è lo *Staphylococcus aureus*, che prende il nome di *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) [12].

Un secondo gruppo è determinato dalla compromissione nel passaggio dell'antibiotico all'interno del batterio. Tale resistenza può essere naturale, dovuta ad esempio all'incapacità dei glicopeptidi, data la loro struttura, di attraversare la membrana esterna dei gram-, oppure acquisita, in seguito ad eventi mutazionali, che portano ad una riduzione o mancata espressione di porine, proteine presenti nel doppio strato fosfolipidico esterno e sfruttate per l'ingresso nella cellula da numerose classi di antibatterici. Ne è un esempio la resistenza dello *Pseudomonas aeruginosa* ai carbapenemici data da mutazioni che causano una ridotta espressione della porina oprD2 [12].

Il terzo gruppo è mediato invece da meccanismi di efflusso attivo, in grado di impedire che il farmaco raggiunga all'interno della cellula concentrazioni tali da esplicare la sua funzione. Tale sistema di difesa può essere secondario a eventi genetici che portano all'aumento dell'espressione di pompe di efflusso, costitutivamente presenti, in grado di espellere numerose sostanze anche strutturalmente diverse, comprese diverse classi di antibiotici, potendo conferire una multiresistenza (pompe di efflusso multidrug). Esistono poi le pompe di efflusso specifiche, selettive per una determinata

classe di antibiotici, solitamente acquisite in seguito al trasferimento genico orizzontale di plasmidi [12].

Nell'ultimo gruppo sono inclusi quei meccanismi di resistenza che si esplicano attraverso la modificazione della struttura chimica del farmaco e una sua conseguente inattivazione. Tale alterazione è permessa da enzimi specifici. Acetil-transferasi (AAC), nucleotidil-transferasi (ANT) e fosfo-transferasi (APH) sono in grado di inattivare gli aminoglicosidi mediante l'aggiunta di gruppi acetili, adenili e fosfati. Si può osservare anche l'inattivazione del cloramfenicolo in seguito ad acetilazione ad opera dell'enzima CAT [12].

Le β -lattamasi idrolizzando l'anello β -lattamico impediscono l'interazione della molecola con il bersaglio. Tuttavia, se è pur vero che la struttura fondamentale dei beta-lattamici è sempre la stessa, costituita dall'acido 6-aminopenicillanico per le penicilline e l'acido 7-aminocefalosporanico per le cefalosporine, la modificazione delle catene laterali ne influenza non solo lo spettro d'azione e la farmacocinetica, ma anche la possibilità di essere riconosciuti o meno da determinate beta-lattamasi [14].

Le beta-lattamasi sono una classe di enzimi molto eterogenea dal punto di vista funzionale con capacità di inattivare β -lattamici differenti e con spettro d'azione variabile. Quelle a codificazione cromosomica, prodotte costitutivamente e spesso inducibili sono responsabili di una resistenza intrinseca, che interesserà solamente quella specie batterica. Quelle a espressione plasmidica tuttavia sono quelle di maggiore riscontro ed interesse in ambito clinico e di salute pubblica. Tale supremazia si deve alla possibilità di diffondersi ad altri ceppi e specie batteriche mediante meccanismi di trasferimento genico orizzontale [15].

Vi sono diverse modalità di classificare le β -lattamasi. Ci si può basare sulla struttura molecolare suddividendole nelle classi A, B, C, D. In base alle caratteristiche del sito

attivo le classi A, C, D rientrano nelle serina β -lattamasi, mentre la classe B, per la presenza dello ione zinco nel sito attivo, prende il nome di metallo- β -lattamasi [15].

Un'altra classificazione è quella di distinguere le β -lattamasi in base all'attività funzionale in 4 gruppi, ulteriormente suddivisibili in sottogruppi indicati con delle lettere, basandosi sulla loro capacità di idrolizzare differenti composti β -lattamici, utilizzati quindi come substrati biochimici per la caratterizzazione fenotipica, e sulla sensibilità all'azione degli inibitori delle β -lattamasi [15]. Si può osservare una certa correlazione fra le 2 classificazioni, con il gruppo 1, a cui appartengono le cefalosporinasi, che corrisponde alla classe C, il gruppo 2 appartenente alle classi A e D è il più ampio gruppo di beta-lattamasi, in cui sono incluse le penicillinasi, le ESBL, le beta-lattamasi ad ampio spettro resistenti agli inibitori e le serin-carbapenemasi; infine il gruppo 3, sovrapponibile alla classe B, è costituito dalle metallo-beta-lattamasi. Il gruppo funzionale 4 include invece enzimi attualmente non ben caratterizzati, e che probabilmente, una volta che si avranno più informazioni a disposizione, potranno essere inseriti in uno dei 3 gruppi precedenti [15].

3 Trasferimento genico orizzontale

Nel regno batterico la trasmissione del corredo genetico, sia esso cromosomico o plasmidico, non si verifica solo in maniera verticale, mediante scissione binaria, ma può avvenire anche in maniera orizzontale, seppure parzialmente, attraverso segmenti di DNA di dimensioni variabili, permettendo la diffusione, in altri ceppi della stessa specie o in specie differenti, di geni che possono codificare anche per fattori di virulenza o di resistenza.

Questo processo può avvenire mediante 3 diversi meccanismi:

- la trasformazione;

- la trasduzione;
- la coniugazione.

La trasformazione è un processo che permette ad una cellula batterica di captare dall'ambiente esterno frammenti di Dna eterologo rilasciati da altre cellule ed integrarlo mediante ricombinazione omologa. Questo meccanismo riguarda quelle specie batteriche che possiedono tutto il corredo genetico necessario per passare allo stato di competenza, quali lo *Streptococco*, la *Neisseria* e l'*Haemophilus* [16].

Nella trasduzione il passaggio di materiale genetico da un batterio all'altro è mediato dai fagi, virus in grado di parassitare i batteri e sfruttarli come macchinari per la propria replicazione [16].

Sia la trasduzione che la trasformazione avvengono però principalmente fra batteri della stessa specie o strettamente imparentati (dovuti ad esempio all'espressione di specifici recettori riconosciuti da un determinato fago) [17].

La coniugazione prevede che, per il trasferimento genico, avvenga un contatto, mediante il pilo sessuale o coniugativo, fra cellula donatrice e cellula ricevente. È con questo meccanismo che avviene il trasferimento dei plasmidi coniugativi e dei trasposoni coniugativi [16]. È importante sottolineare che è proprio a livello di questi 2 elementi che si trovano la maggior parte dei geni accessori che codificano per fattori di resistenza e di virulenza [16]; inoltre i plasmidi e i trasposoni coniugativi possono diffondersi anche fra specie batteriche diverse e non necessariamente simili fra loro, diventando il principale determinante della propagazione, anche fra specie batteriche non correlate, dell'antibiotico resistenza [16,17].

3.1 Plasmidi

I plasmidi sono molecole di DNA extracromosomico, circolari e a doppio filamento, che possono moltiplicarsi indipendentemente dal cromosoma batterico. Di dimensioni variabili da 1 a più di 250 kbp [16,18], non esprimono funzioni indispensabili alla sopravvivenza del microorganismo quali la replicazione, la trascrizione, la sintesi proteica e le funzioni metaboliche necessarie all'accrescimento e alla moltiplicazione, bensì molti dei geni plasmidici sono coinvolti nella virulenza del ceppo e, codificando tossine, molecole di adesione e di antibiotico-resistenza, conferiscono un vantaggio selettivo in determinate condizioni [16]. Inoltre, alcuni di questi hanno la capacità, mediante processo di coniugazione, di trasferirsi da un batterio all'altro, o codificando loro stessi, mediante i geni tra e mob, il macchinario per il trasferimento genico orizzontale (self transmissible plasmids), oppure sfruttando l'apparato presente nel materiale genetico del batterio ma non codificato da quel plasmide (mobilizable plasmids) che presenterà nel suo corredo genetico solo i geni mob [17,19].

Possono essere presenti da una o poche copie fino a diverse centinaia; tuttavia il numero di copie per quel plasmide, all'interno della cellula è costante. Questo è permesso dal fatto che la replicazione autonoma dei plasmidi avviene in maniera auto-regolata, solitamente con strategie di tipo inibitorio, garantendo una proporzionalità inversa fra il numero di copie e il tasso di replicazione [20,21].

La porzione minima del plasmide in grado di garantire la replicazione e la sua regolazione è chiamato replicone di base. Questo non solo contiene l'origine di replicazione, ma contiene anche i geni codificanti specifiche proteine iniziatrici la replicazione (REP) che si legheranno alla sequenza ori, ed i loro fattori di regolazione [21].

I plasmidi che possiedono sequenze e meccanismi di controllo della replicazione identici o simili, vengono definiti incompatibili non potendosi mantenere stabilmente all'interno di una stessa linea cellulare. Infatti, il meccanismo repressore di un plasmide percepirà un altro plasmide della stessa famiglia di incompatibilità (Inc. group) semplicemente come un'ulteriore copia, impedendone la replicazione [20].

Plasmidi che invece hanno differenti meccanismi di controllo potranno replicare indipendentemente uno dall'altro ed ognuno sarà ripartito fra le cellule figlie che quindi, anche dopo numerose divisioni, presenteranno ancora entrambi i plasmidi.

I plasmidi a basso numero di copie presentano inoltre un meccanismo di segregazione specifico mediato dalla regione Par, che ne permette una eguale ripartizione nelle cellule figlie. L'incompatibilità plasmidica si può quindi riscontrare anche fra plasmidi che presentano le stesse regioni Par. [20]

3.2 Trasposoni

I trasposoni fanno parte degli elementi genetici trasponibili.

Quest'ultimi sono elementi di DNA che possono spostarsi da una parte del genoma all'altra, sia all'interno della stessa molecola, sia in molecole differenti, compresi i plasmidi self transmissible mediante un meccanismo di ricombinazione sito-specifico [16].

L'elemento genico trasponibile di più piccole dimensioni è chiamato sequenza di inserzione (IS) e contiene il gene trasposasi e alle due estremità sequenze ripetute invertite [16].

I trasposoni sono di più grandi dimensioni, costituiti da uno o più geni che possono codificare anche per fattori di virulenza e di antibiotico-resistenza, e sono fiancheggiati da 2 identiche IS [16]. Possono presentare anche i geni tra ed in questo caso saranno

chiamati trasposoni coniugativi, e possiederanno la capacità di trasferirsi in altre cellule batteriche, anche di specie differenti e non strettamente imparentate [19] dimostrando anche la potenzialità di trasporarsi in alcuni casi fra batteri gram negativi e batteri gram positivi [17].

4 *Escherichia Coli*

L'*Escherichia Coli* è un bacillo gram negativo aerobio-anaerobio facoltativo, lattosio fermentante, che fa parte della famiglia delle Enterobacteriaceae. Il suo habitat naturale è a livello dell'intestino umano e animale e rappresenta nell'uomo la specie predominante fra i batteri aerobi-anaerobi facoltativi residenti nell'intestino crasso. Questo fa sì che il riscontro di *E. coli* in un qualsiasi materiale, nel suolo, o nelle riserve idriche sia indicativo di contaminazione fecale [22]. Basandosi sull'antigene O (costituito dalla catena polisaccaridica del lipopolisaccaride) è possibile categorizzare tale specie in numerosi sierotipi e, a parità di sierotipo, è possibile un'ulteriore differenziazione in base agli antigeni K (rappresentati dal polisaccaride capsulare, fattore di patogenicità non sempre presente) e H (determinati dalle proteine flagellari) [22].

4.1 Principali patologie determinate dagli *E. coli*

Anche se presente fisiologicamente come commensale intestinale, può essere causa di infezioni opportuniste in seguito alla localizzazione in altri distretti dell'organismo o causare infezioni a livello della sua sede naturale in seguito all'acquisizione di specifici fattori di virulenza [23].

L'*E. coli* può portare alla comparsa di:

- meningiti neonatali (80% sintetizza l'antigene capsulare K1 che ha notevole azione anti-fagocitaria e sembra contrastare l'azione litica del complemento) [22].
- Infezioni ascendenti delle vie urinarie, nella maggior parte dei casi determinate da *E. coli* denominati uropatogeni in quanto hanno acquisito la capacità di esprimere specifiche adesine (Pili P mannosio resistenti, fimbrie Dr, AAF/II, AAF/III), che gli permettono di ancorarsi saldamente all'urotelio resistendo all'eliminazione dei batteri che si verifica fisiologicamente con la minzione [23].
- Gastroenteriti, con manifestazioni cliniche differenti in base ai meccanismi eziopatogenetici sottostanti, a loro volta determinati dalla presenza di differenti, specifici, fattori di virulenza. L' *Escherichia coli* enterotossigeno (ETEC), è responsabile della diarrea del viaggiatore, una diarrea acquosa, conseguente all'ingestione di acqua o alimenti contaminati da *E. coli* in grado di elaborare almeno 2 tipi di tossine, la LT, termolabile, e la ST, termostabile, i cui effettori finali sono rispettivamente l'adenilatociclasasi e la guanilatociclasasi che, rese costitutivamente attive, determinano una continua fuoriuscita nel lume intestinale di acqua ed elettroliti. Gli *E. coli* enteropatogeni (EPEC), grazie ad una specifica isola di patogenicità, sono in grado di determinare un'adesione stretta sull'epitelio intestinale, replicarsi attivamente portando alla degenerazione dei microvilli, causando infine una diarrea mucosa in parte determinata dal malassorbimento secondario alla distruzione dei microvilli stessi. Gli *E. coli* enteroinvasivi (EIEC) sono in grado di invadere le cellule epiteliali del colon, facendosi fagocitare da quest'ultime, replicarsi al loro interno e poi diffondere ad altre cellule, con distruzione progressiva dell'epitelio stesso e reazione infiammatoria che può essere causa di manifestazioni dissenteriche (comparsa di febbre, crampi, sangue, muco e leucociti nelle feci) e ulcerazione

del colon. Gli *E. coli* enteroemorragici (EHEC) sono causa di malattia prevalentemente nei paesi industrializzati. Fra gli alimenti più frequentemente fonte di contagio rientrano la carne macinata di manzo poco cotta, succhi di frutta e vegetali crudi. Sono simili ai ceppi EPEC, ma sono in grado di produrre anche la tossina shiga-like, analoga a quella prodotta dalla *Shigella dysenteriae*, che una volta internalizzata nella cellula è in grado di bloccare la sintesi proteica, con distruzione dei villi e comparsa di diarrea sanguinolenta. Nei soggetti pediatrici, soprattutto quelli di età inferiore ai 10 anni, l'infezione si può complicare con la comparsa di una sindrome emolitico-uremica (SEU) caratterizzata da trombocitopenia, anemia emolitica microangiopatica ed insufficienza renale acuta. Gli *E. coli* enteroaggreganti (EAEC) sono in grado di aderire e colonizzare l'intestino tenue e stimolare la formazione di muco che contribuirà alla formazione di un biofilm. Tipica dei paesi in via di sviluppo, tende a causare diarrea acquosa persistente, con rischio di disidratazione soprattutto nell'infanzia [23]. Infine, gli *E. coli* diffusamente aderenti (DAEC) sono causa di diarrea soprattutto nei bambini di età inferiore ai 5 anni. Tale aderenza diffusa è determinata dal fatto che quest'ultimi, dopo un'iniziale adesione agli enterociti, inducono una trasduzione del segnale con la produzione dell'interleuchina 8 come effettore finale che agirà da fattore chemiotattico richiamando i polimorfonucleati i quali a loro volta stimoleranno gli enterociti a sintetizzare ed esprimere una maggiore quantità di DAF (fattore accelerante il decadimento), utilizzato dai DAEC come recettore per l'adesione. Oltre a ciò, la sintesi dell'esotossina Sat determina un'alterazione della giunzione intercellulare causando un aumento della permeabilità paracellulare responsabile delle manifestazioni diarroiche [24].

- Setticemia, spesso secondaria ad un'infezione delle vie urinarie o del tratto gastroenterico, favorita da condizioni predisponenti quali diabete o condizioni di immunosoppressione [23].
- Colangiti ascendenti, spesso favorite da una condizione predisponente di ostruzione o stasi biliare [25].
- Polmoniti, riscontrate molto raramente nel setting comunitario rispetto a quello nosocomiale nel quale rivestono un ruolo importante come agenti eziologici, soprattutto nei pazienti ricoverati nei reparti di terapia intensiva dove possono essere causa di polmoniti associate alla ventilazione meccanica (VAP) [26,27].

4.2 Epidemiologia dei pattern di resistenza negli *E. coli*

Nei gram-, inclusa la famiglia delle Enterobacteriaceae, il meccanismo di resistenza principale ai beta-lattamici sono proprio le beta-lattamasi [28], soprattutto quelle a codificazione plasmidica, che grazie a meccanismi di trasferimento genico orizzontale, ne hanno permesso un'ampia diffusione anche fra specie differenti. Un problema rilevante di salute pubblica è la diffusione nei gram negativi di resistenze alle cefalosporine di 3° generazione. Questa resistenza è mediata da 2 principali classi di enzimi, le ESBL e le AmpC.

Le AmpC sono degli enzimi di classe molecolare C, gruppo funzionale 1 ad espressione sia cromosomica che plasmidica responsabili di una resistenza principalmente nei confronti delle cefalosporine di prima e seconda generazione incluse le cefamicine, l'aztreonam, le penicilline, e presentando una resistenza nei confronti del blocco dell'attività da parte degli inibitori delle beta-lattamasi. L' *E. coli* esprime costitutivamente tali enzimi, ma in questa specie l'espressione avviene a bassi livelli e non è inducibile svolgendo un ruolo di protezione contro i beta-lattamici poco

significativo. Tuttavia, negli ultimi 30 anni si è osservata la diffusione di tali geni anche a livello plasmidico, e questi geni solitamente non presentano meccanismi di regolazione e vengono quindi espressi ad alti livelli conferendo resistenze anche nei confronti delle ossimino-cefalosporine ma non delle cefalosporine di 4° generazione quali il cefepime nei confronti delle quali tendono a rimanere suscettibili. Inoltre, anche mutazioni, sia a livello cromosomico che soprattutto a livello plasmidico, possono essere responsabili di questa espansione del profilo di resistenza [29,15].

Ad ogni modo questi enzimi contribuiscono solo in maniera parziale alla resistenza nei confronti delle cefalosporine di 3° generazione. Gli enzimi più frequentemente coinvolti in tale fenotipo di resistenza sono le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL: extended spectrum β -lactamase) [29], che comprende il più vasto gruppo di enzimi [15] e sulle quali concentreremo il nostro studio per l'importanza e la diffusione che si sta osservando negli ultimi 3 decenni.

Sono prevalentemente enzimi di classe molecolare A, gruppo funzionale 2, sottogruppo be, capaci di idrolizzare, oltre alle penicilline e alle early cefalosporine, anche le ossimino-cefalosporine ed i monobattamici ed hanno un'attività spesso elevata nei confronti delle cefalosporine di 4° generazione (cefepime e cefpirome) mentre non idrolizzano le cefamicine (cefoxitina e cefotetan) nè i carbapenemici; inoltre vengono inibite in vitro dagli inibitori delle β -lattamasi (acido clavulanico, tazobactam, sulbactam, avibactam) [15,30]. È importante specificare che questa inibizione potrebbe non verificarsi in vivo, in seguito alla iperproduzione di enzima o alla co-produzione di beta-lattamasi resistenti agli inibitori [30]

All'interno di questo sottogruppo funzionale, è possibile poi distinguere diverse famiglie di enzimi, sulla base dell'omologia della struttura amminoacidica primaria; quelle più frequentemente isolate sono le SHV, TEM, CTX-M [15].

Inizialmente individuate verso la fine degli anni '80 [28] quando, in seguito allo sviluppo e successiva messa in commercio di ben 24 beta-lattamici, di cui 15 cefalosporine [31], si riscontrarono diversi focolai di infezioni da Enterobacteriaceae resistenti alle cefalosporine di 3° generazione [28].

Successivamente all'isolamento e identificazione degli enzimi coinvolti in questi pattern di resistenza, si osservò che la predominanza era di derivazione SHV o TEM [28,32] in seguito alla sostituzione di pochi amminoacidi nelle regioni codificanti [32]. A partire dai primi isolamenti alla fine degli anni 80, si è osservata una massiva diffusione, dal 1995 in poi, degli enzimi CTX-M ora presenti in gran parte del mondo, diventando, dal punto di vista epidemiologico, uno dei maggiori responsabili dell'aumento assoluto delle ESBL nelle Enterobacteriaceae e, in alcune specie batteriche, incluso l'*E. coli*, la principale causa della resistenza a spettro esteso [33,34,35].

In Italia si è osservato un progressivo aumento delle Enterobacteriaceae ospitanti ESBL. Studi condotti a partire da campioni provenienti da pazienti sia nosocomiali che comunitari, hanno dimostrato un incremento delle infezioni da enterobatteri ESBL positivi, passando da una prevalenza del 6,4% nel 2003 al 14,4% nel 2013. Precisamente, in ambito nosocomiale si è passati dal 6,3% nel 1999 al 7,4% nel 2003, per arrivare al 18,4% nel 2013. Per i pazienti con infezioni comunitarie non si hanno dati riferibili al 1999, ma dal 2003 al 2013, quindi nell'arco di 10 anni, si è osservato un incremento dal 3,5% all'11% [36,37,38].

Questo andamento generale rispecchia quello delle infezioni determinate dagli *E. coli*. Infatti, sul totale delle infezioni da *Escherichia coli*, quelle ESBL positive sono passate dal 3,6% al 15,6% nell'arco di 10 anni. Precisamente, in ambito nosocomiale, c'è stata un'evoluzione dall'1,2% nel 1999 al 4,4% del 2003, raggiungendo il 23% nel 2013.

Anche nelle infezioni comunitarie, spesso infezioni endogene delle vie urinarie, si è osservato un aumento dal 1,9% del 2003 al 10,9% del 2013 [36,37,38].

Sulla base dei dati ottenuti dal report annuale della rete di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza europea (EARS-Net 2018), considerando la media europea dei paesi, la situazione è analoga, con un tasso di *E. coli* resistenti alle cefalosporine di 3° generazione del 15,1%. Tuttavia, andando ad indagare i tassi di resistenza nei singoli paesi, si osserva un'ampia divergenza, con i valori più elevati presenti nei paesi del sud Europa ed est Europa. Nel 2018, a 5 anni di distanza, la resistenza alle cefalosporine di 3° generazione in Italia è risultata essere del 28,7% [39]. Bisogna però precisare che un confronto diretto fra i dati della sorveglianza a livello nazionale attuata nel 2013 e quella fatta nel 2018 e trasmessa a livello europeo non sarebbe appropriato poiché l'EARS-Net prende in considerazione solo la resistenza alle cefalosporine di 3° generazione senza indagare il meccanismo alla base.

È tuttavia vero, come descritto precedentemente e come è possibile anche osservare nello studio nazionale del 2013, che la maggior parte della resistenza alle cefalosporine di 3° generazione è mediata dalle ESBL piuttosto che dalle AmpC [38]. Anche confrontando la resistenza per le altre classi antibiotiche quali i fluorochinoloni, gli aminoglicosidi e le aminopenicilline, la situazione è la medesima, con l'Italia che si colloca sempre al di sotto della media europea. Dato molto positivo riguarda la resistenza europea ed italiana degli *E. coli* ai carbapenemici, rispettivamente inferiore allo 0,1% e allo 0,5% [39]. La tabella sottostante riporta la percentuale di *E. coli* resistenti alle aminopenicilline, ai carbapenemici, alle cefalosporine di 3° generazione, agli aminoglicosidi, ai fluorochinoloni e quelli che presentano co-resistenza agli ultimi 3 antibiotici citati, isolati da campioni di sangue o di liquido cefalorachidiano.

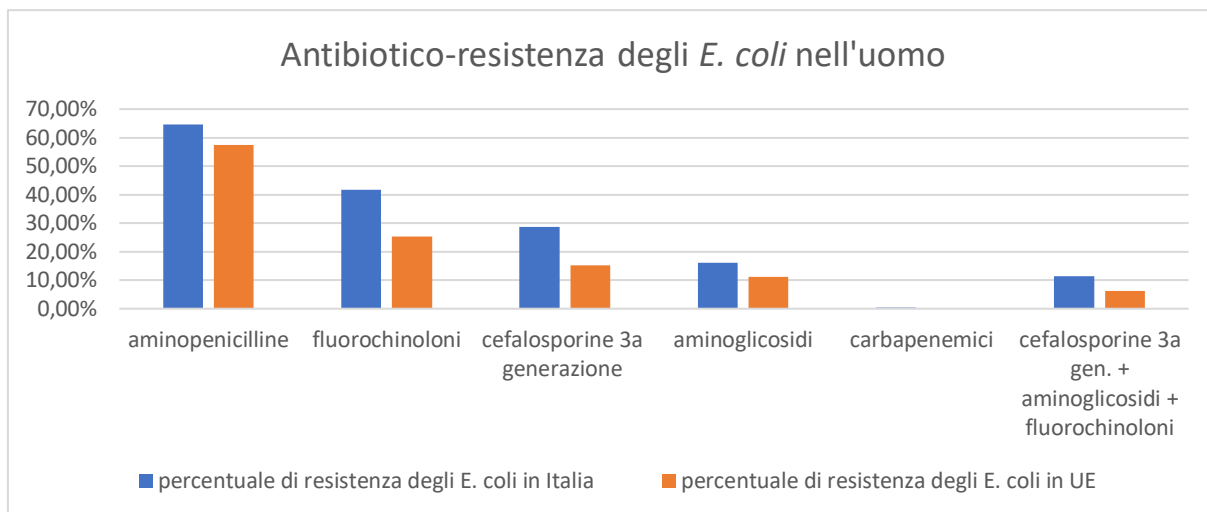


Figura 1. Occorrenza della resistenza antibiotica negli *E. coli* ottenuti da campioni ematici o di liquido cefalorachidiano in Italia e nell'Unione Europea.

5 Sviluppo e diffusione dell'antibiotico resistenza

5.1 Ruolo dell'uso antibiotico nell'uomo e negli animali

La maggior parte degli antibiotici attualmente conosciuti ed in uso sono di origine semisintetica, sviluppati a partire da composti naturali. Tali sostanze infatti, nel normale processo evolutivo di selezione naturale, hanno conferito un beneficio in termini di sopravvivenza in ambienti ostili ai microrganismi produttori, fungendo da segnali di comunicazione intercellulare, o permettendo un vantaggio nutrizionale contro microrganismi che competono per le stesse sostanze nutritive. Al contrario i meccanismi di resistenza si sarebbero sviluppati come meccanismo di difesa a sostanze nocive prodotte da altri organismi. Oltre a ciò, un'altra possibilità è che gli enzimi e le varie proteine responsabili dei meccanismi di resistenza, riscontrati in batteri anche risalenti a migliaia di anni fa, svolgessero ruoli metabolici di vario genere, e che solo nell'ultimo secolo, come conseguenza dell'attività umana ci sia stato un cambio nel loro ruolo funzionale [40,41,42,43].

Tuttavia, pur trattandosi di un processo naturale, la comparsa e diffusione dell'antibiotico-resistenza è stata ed è fortemente incentivata dall'uso degli antibiotici. Questi infatti, mediante un meccanismo di pressione selettiva, sono in grado di eliminare non solo i microrganismi patogeni sensibili e responsabili dell'infezione ma anche quelli appartenenti alla normale flora microbica residente, lasciando liberi i batteri resistenti di crescere, moltiplicarsi ed espandersi divenendo la popolazione predominante.

Oltre a ciò i batteri, durante i meccanismi di duplicazione del Dna, possono andare incontro ad eventi mutazionali, casuali, determinati dagli errori di replicazione della DNA polimerasi, che tuttavia potrebbero conferire potenziali caratteristiche di resistenza [41,44]; e se tale evento mutazionale si verifica in un ambiente in cui è presente un'elevata concentrazione antibiotica, i batteri con tale mutazione saranno favoriti nella sopravvivenza e successiva replicazione rispetto agli altri microrganismi della stessa specie.

A contribuire a tale antibiotico-resistenza vi è anche la cattiva gestione di tali presidi farmacologici, che spesso vengono prescritti anche quando non necessari, o con posologia o durata del trattamento inadeguate. Su questi aspetti determinante è l'azione del medico; ma a giocare un ruolo rilevante è anche una corretta informazione del paziente, per garantirne un'adeguata compliance.

Importante è anche la scelta corretta del giusto antibiotico. Nel caso di forme severe di infezione, quali la sepsi, fondamentale è l'inizio precoce del trattamento antibiotico, che sarà, non conoscendo l'agente eziologico, empirico, con la combinazione di 2 o più farmaci ad ampio spettro. Successivamente alla diagnosi microbiologica e alla determinazione del profilo di resistenza, è importante passare ad una terapia più mirata [45]. Questa terapia, agendo in maniera più selettiva nei confronti dell'agente eziologico, ridurrà l'azione sulla flora microbica presente e sullo sviluppo di resistenze.

I dati provenienti dall'ESAC-Net (European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network) offrono una chiara evidenza dell'associazione fra i tassi di resistenza nell'*E. coli* e il consumo di antibiotici a livello ospedaliero e comunitario in ciascuna nazione. I consumi fra le varie nazioni presentano un ampio divario, e nelle nazioni in cui si ha un maggiore utilizzo di antimicrobici si osserva anche un maggior tasso di resistenze [39,46,47].

Il secondo report congiunto fra EMA, ECDC ed EFSA sull'analisi integrata del consumo di agenti antimicrobici e insorgenza di resistenza antimicrobica nei batteri provenienti dall'uomo e dagli animali da produzione alimentare evidenzia come il consumo medio di antimicrobici negli animali da allevamento sia più alto (152mg/kg) rispetto a quello sull'uomo (124mg/kg). In Italia tale divario è ancor più considerevole passando da un consumo di 166.9 mg/kg nell'uomo a 359.9 mg/kg negli animali da produzione alimentare [46].

La scelta di tale unità di misura, utilizzata in ambito veterinario e per questo confronto adattata all'uomo, è dovuta al fatto che non è sufficiente basarsi sulla vendita complessiva di principio attivo, poiché risulterebbe improprio in quanto non tiene conto della quantità totale di animali a cui questi vengono somministrati. Si utilizza come indicatore per esprimere le vendite di farmaci, i milligrammi di principio attivo venduti per PCU (population correct unit) in Kg. La PCU è calcolata moltiplicando, per ciascuna categoria di bestiame, il numero di animali da allevamento per il loro peso teorico nel momento più probabile del trattamento. Per avere un'idea della quantità di farmaci di cui stiamo parlando, in Europa, nel 2017, si sono vendute 6634,4 tonnellate di antibiotici (il dato prende in considerazione solo la quantità di principio attivo) per uso veterinario negli animali d'allevamento, con una vendita in Italia di 1057,8 tonnellate. Nel nostro paese più del 60% di questi sono costituiti principalmente da 3 classi di antibiotici: le penicilline, le tetracicline e i sulfamidici. L'utilizzo delle cefalosporine di 3°

e 4° generazione rappresenta uno 0,14% del totale, che corrisponde comunque 1,5 tonnellate complessive di sostanza [48]. Tuttavia, questi dati non ci permettono di valutare come le varie classi di antibiotici vengono distribuite nelle varie linee produttive presenti in un determinato paese, quali ad esempio quella suinicola e avicola, più a rischio per l'effettuazione di trattamenti di gruppo mediante mangime ed acqua abbeverata come via di somministrazione [49,50]. Questi trattamenti di gruppo sono alla base della profilassi e della metafilassi e, in base al tipo di infezione che influenza la potenziale via di somministrazione del farmaco, anche a scopi terapeutici. La metafilassi ha lo scopo di trattare gli animali malati ma soprattutto prevenire e controllare la diffusione della malattia negli animali sani a stretto contatto che potrebbero già presentare l'infezione a livello subclinico, quando per tale controllo non sono disponibili alternative adeguate [49,50].

Come per l'uomo, anche in questo caso la pressione selettiva secondaria all'uso degli antibiotici favorisce lo sviluppo e la persistenza di geni di antibiotico-resistenza. La regolamentazione del loro utilizzo è fondamentale per ridurre l'abuso, come il divieto imposto nel 2006 del loro utilizzo come fattori di crescita nell'Unione Europea [51].

In Italia, la percentuale di *Escherichia coli* completamente sensibile a tutti gli antibiotici usati come indicatori nel programma di sorveglianza europeo, conformemente alla Commission Implementing Decision 2013/652/EU, nelle varie linee produttive era rispettivamente del 10,6% nei suini, 15,3% nei polli da carne, 19,4% nei vitelli di età inferiore ad un anno e del 12,9% nei tacchini [52].

Per quanto riguarda le resistenze, il riscontro dei valori più elevati si ha nei confronti dell'ampicillina, tetraciclina, sulfametossazolo, trimetoprim, ciprofloxacina per le quali gli *E. coli* isolati dai polli e dai tacchini presentano valori superiori al 50% [52].

Per quanto riguarda i dati provenienti da suini e vitelli, valori inferiori al 50% si hanno solo per la ciprofloxacina, anche se con un grande divario fra i 2 in quanto mentre per i suini questa si attesta sul 22,4%, nei vitelli è del 47,6% [52].

La resistenza alle cefalosporine di 3° generazione, precisamente al cefotaxime ed al ceftazidime, erano rispettivamente del 2,4% e 1,8% nei polli da carne, 1,2% per entrambe le sostanze nei tacchini, 1,2% e 0,6% per i suini, e 5,3% per entrambe le sostanze nei vitelli di età inferiore ad un anno [52].

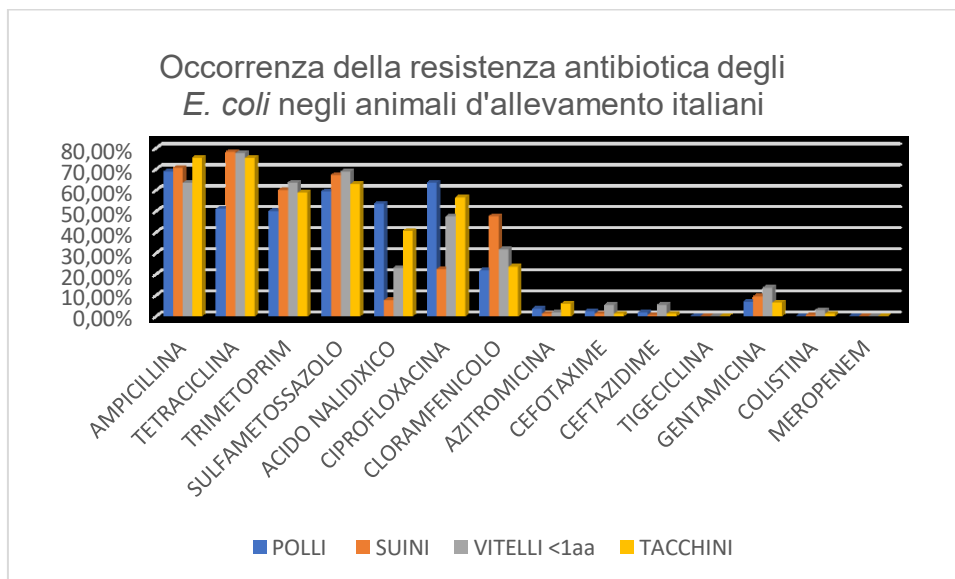


Figura 2. Tassi di occorrenza delle resistenze in isolati di *E. coli* ottenuti da campioni cecali animali.

Anche per gli animali si può osservare come, in linea generale, le resistenze di maggiore riscontro siano proprio nei confronti degli antibiotici più venduti. Questi dati confermano il rapporto che esiste fra la vendita e il consumo di antibiotici e la rispettiva resistenza negli animali da produzione alimentare sia nel singolo stato, sia fra i vari stati.

Questo approccio, valutando la percentuale di *E. coli* resistenti su isolati di *E. coli* selezionati casualmente, fornisce un grado di sensibilità inferiore rispetto a quello ottenuto effettuando un monitoraggio specifico con terreni di coltura selettivi.

Il monitoraggio specifico è in grado di rilevare un numero molto basso di isolati resistenti presenti all'interno di campioni provenienti dal cieco degli animali e ottenuti al momento della macellazione, permettendo di ottenere dati inerenti la prevalenza di questi batteri resistenti nel bestiame.

Con il monitoraggio specifico degli *E. coli* ESBL effettuato nel 2017 per i suini e i bovini e nel 2018 per i polli e i tacchini da carne i dati italiani identificano una prevalenza di ESBL nel pollame del 63,7%, nei tacchini del 53,1%, nei maiali del 69,2%, e nei vitelli del 86,8% [52].

La scelta di valutare il tasso di resistenza nella popolazione di *E. coli* è dovuta al fatto che, in quanto commensali intestinali, sono costantemente sottoposti alla pressione selettiva antibiotica ogniqualvolta si attua una somministrazione di antimicrobico.

Possono quindi essere utilizzati come indicatori del tasso di resistenza in una determinata area geografica e del rischio di una sua disseminazione. Una potenziale via di diffusione è quella che vede un coinvolgimento diretto dei microrganismi, che possono trasferirsi in altri organismi superiori, passando dagli animali all'uomo, dall'uomo agli animali, da una persona all'altra, o da un animale all'altro; animali spesso costretti a vivere a stretto contatto gli uni con gli altri per via degli spazi ridotti in cui vengono allevati [52].

L'altra potenziale via di diffusione riguarda la trasmissione esclusiva delle resistenze mediante trasferimento genico orizzontale in altre specie, comprese quelle patogene sia per l'uomo che per gli animali; condizione che può verificarsi anche all'interno del lume intestinale [53]. L'acquisizione da parte di agenti patogeni di uno o più pattern di resistenza risulta infatti essere un importante problema di salute pubblica e veterinaria

in quanto queste infezioni, più difficili da debellare, comporteranno importanti costi, sia in termini di vite umane e animali che economici [52].

5.2 Ruolo del contatto diretto ed indiretto

La diffusione di microrganismi resistenti può avvenire da persona a persona. Un soggetto che presenta un'infezione o anche solo una colonizzazione da ceppi resistenti può trasmetterla ad altri soggetti.

Nel caso delle Enterobacteriaceae, la via di trasmissione è oro-fecale e può essere diretta o più frequentemente indiretta.

La trasmissione diretta è rara e si ha per contatto diretto fra l'individuo sano e quello malato. Ha rilevanza solo in particolari ambienti come quello domestico, ospedaliero o in comunità quali quella infantile.

La via indiretta è quella più frequente. In questo caso il contatto fra i due soggetti è mediato da diversi vettori o veicoli:

- cibo;
- fluidi;
- suolo;
- mani;
- mosche;
- oggetti inanimanti, che hanno particolare rilevanza soprattutto in luoghi chiusi quali gli ospedali e le abitazioni.

È proprio il setting ospedaliero quello dove si osserva il più alto carico di batteri resistenti in virtù della vicinanza di un elevato numero di persone ricoverate e l'uso considerevole di molti antibiotici che concorrono a creare un ambiente favorevole allo sviluppo e disseminazione di resistenze. 5 differenti vie, fra loro strettamente

interconnesse sono alla base del rischio di colonizzazione o infezione di soggetti suscettibili da parte di batteri resistenti [54]:

- trasmissione dei microorganismi dal paziente colonizzato o infetto al personale sanitario, a livello soprattutto di mani, guanti ed abiti;
- trasmissione dal paziente all'ambiente circostante;
- trasmissione dall'ambiente al personale sanitario;
- trasmissione dal personale sanitario a pazienti suscettibili;
- trasmissione dall'ambiente al paziente. “A supporto di questa affermazione alcuni studi hanno dimostrato che un paziente ricoverato in una stanza in cui era precedentemente assistito un soggetto portatore di microrganismi resistenti aveva un maggiore rischio di divenire colonizzato a sua volta” [54,55,56].

Fondamentale è agire in modo preventivo per interrompere queste vie di disseminazione mediante un accurato lavaggio delle mani, una sanificazione ambientale, e ricorrendo alle precauzioni da contatto quando necessario [54,57].

Oltre al contatto interumano, in alcuni studi si è osservato che particolari categorie professionali, come gli allevatori, lavorando a stretto contatto con gli animali, presentano un aumentato rischio di colonizzazione da parte di batteri resistenti [58,59,60].

5.3 Ruolo della catena alimentare

La via alimentare rappresenta un'ulteriore potenziale via di diffusione di batteri resistenti come di quelli patogeni, rientrando nelle vie di trasmissione oro-fecale.

Fra gli alimenti coinvolti vi sono quelli che vengono consumati crudi, come i vegetali. Anche la carne gioca un ruolo importante, soprattutto se non adeguatamente cotta, e la stessa cosa interessa il latte assunto senza preventivi trattamenti di pastorizzazione.

Il passaggio all'uomo può avvenire non solo mediante l'ingestione ma anche attraverso la semplice manipolazione del cibo a mani nude [61,62].

Il monitoraggio selettivo a livello europeo degli *Escherichia coli* ESBL produttori nella carne di suino, vitello e pollo ha identificato una prevalenza rispettivamente del 4,7%, 3,9% e 25,7%. In Italia i dati sono rispettivamente del 7,0% per la carne di suino, 8,1% per la carne di vitello e del 54,4% per la carne di pollo. Si può osservare come, per la carne di pollo e di vitello, il valore è più del doppio rispetto alla media dei paesi europei [52].

Confrontando questi dati con quelli relativi alla prevalenza degli *E. coli* ESBL nelle feci degli avicoli, che risulta essere del 63,7% possiamo osservare come i dati siano parzialmente sovrapponibili, con la resistenza nella carne di pollo che appare essere leggermente inferiore rispetto a quella riscontrata nell'animale [52].

“Al contrario, per quanto riguarda i suini ed i vitelli, i valori riscontrati nella carne sono notevolmente inferiori rispetto a quelli trovati a livello fecale. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che in questi animali di maggiori dimensioni i batteri presenti a livello fecale non contaminano le carcasse durante il processo di macellazione, o che le contaminano ma vengano poi successivamente rimossi durante il processo di lavorazione” [52].

Il riscontro di *E. coli* resistenti nella carne può avere alla base diverse vie di trasmissione. La carne potrebbe contaminarsi durante il processo di macellazione attraverso il contatto con il pellame o con i visceri ed il loro contenuto. Si potrebbe verificare anche in seguito al contatto con l'ambiente di lavorazione circostante, i macchinari e gli strumenti di lavoro, oppure la contaminazione della carne potrebbe essere causata dai lavoratori stessi durante la sua manipolazione [52,61].

Un'ulteriore conferma sul ruolo giocato dalla carne come via di trasmissione deriva dall'analisi genetica del profilo di resistenza. Valutando infatti la sovrapposizione e la

concordanza fra i geni di resistenza riscontrati nel cibo e nell'uomo si ha una visione più chiara sul suo ruolo come fonte di disseminazione. Un esempio lo si può trovare in uno studio che, mettendo a confronto i geni di resistenza codificanti le beta-lattamasi a spettro esteso nella carne di pollame e in tamponi rettali umani, ha osservato come questi siano identici nella maggior parte dei casi [63].

Tale via di diffusione non si limita alle realtà locali, ma la massiva importazione ed esportazione di prodotti alimentari rende il problema globale [62].

Per quanto riguarda la presenza di microrganismi antibiotico-resistenti in frutta e verdura, più che ad un diretto uso degli antimicrobici in agricoltura, molto limitato rispetto all'uso veterinario sia per quantità che per numero di classi antibiotiche, nello sviluppo di tali caratteristiche potrebbero giocare un ruolo l'irrigazione delle colture o l'uso di letame contaminati da batteri resistenti e/o antibiotici [64,65,66].

La predominanza di Enterobacteriaceae che albergano le ESBL nelle verdure sono specie ambientali mentre le Enterobacteriaceae fecali nelle quali rientra l'*E. coli* sono solo occasionalmente identificate [67]. La prevalenza di Enterobacteriaceae fecali ESBL positive nei vegetali è solo dello 0,8%, con valori leggermente più elevati per gli ortaggi da radice e gli ortaggi da bulbo dove si sono riscontrati valori del 2,2% [67]. Si può quindi osservare come, rispetto alla carne, questi costituiscano solo un piccolo reservoir, che comunque non deve essere sottovalutato in quanto molti vegetali vengono consumati direttamente crudi e sono stati in alcuni casi alla base di eventi infettivi epidemici da parte di varianti patogene di *E. coli* [67,68].

“Complessivamente, il rischio per la salute pubblica dato dall'assunzione di vegetali contaminati da specie resistenti dipende sì dal rischio di ingestione di batteri opportunisti o patogeni che potrebbero poi causare infezioni più difficili da eradicare, ma soprattutto dalla frequente assunzione di microrganismi ambientali innocui che

potrebbero fungere da rifornimento continuo di resistenze trasmissibili poi alla flora microbica residente” [69].

5.4 Ruolo dei viaggi internazionali

Milioni di viaggiatori si spostano ogni anno oltre i confini nazionali per motivi di lavoro o a scopo turistico. Non tutte le mete sono però uguali per quanto riguarda il rischio di acquisire batteri produttori di ESBL, contribuendone poi alla diffusione una volta ritornati nel proprio paese di origine.

La presenza di batteri con tale resistenza non è esclusiva dell’ambiente ospedaliero; infatti un numero sempre maggiore di infezioni delle vie urinarie, che rientrano fra le infezioni batteriche riscontrate più frequentemente in ambito comunitario, ed il cui agente patogeno più frequente è l’*E. coli*, risultano essere resistenti alle cefalosporine di 3° generazione [70].

In ambito comunitario si può osservare, fra le diverse aree geografiche del globo, una notevole differenza nella prevalenza di portatori fecali di *E. coli* ESBL.

In Europa e in America tale tasso si aggira intorno al 2-4% mentre nelle aree del Medio Oriente, del sudest asiatico e dell’Africa, raggiungono tassi rispettivamente del 15, 22 e 22%, arrivando a valori stimati, nel Pacifico occidentale, del 46% [71].

Il fatto che questi valori così elevati si riscontrino proprio nei paesi in via di sviluppo non è casuale. La presenza di situazioni sociali ed economiche più sfavorevoli, maggiore povertà, alta densità di popolazione e sovraffollamento ospedaliero, scarso accesso all’acqua potabile e smaltimento delle acque reflue difettoso, inadeguato lavaggio delle mani, l’eccessivo ed improprio uso degli antibiotici nella gestione delle infezioni empiriche e nelle attività produttive agricole sono tutti meccanismi favorenti

la disseminazione di malattie a trasmissione oro-fecale, così come delle Enterobacteriaceae ESBL positive [71,72,73,74,75,76].

Il viaggio in questi paesi è uno dei principali fattori di rischio. Uno studio prospettico svedese del 2010 riportò tassi di resistenza dell'88% nei soggetti di ritorno dall'India, del 32% nei soggetti provenienti dalle altre regioni asiatiche e del 29% per coloro che erano di ritorno dalle regioni del Medio Oriente [77].

Un'ulteriore suddivisione si può fare, nei soggetti di ritorno provenienti da questi paesi, fra coloro che durante il loro viaggio all'estero hanno sviluppato la diarrea del viaggiatore e chi non l'ha sviluppata.

Tale manifestazione diarroica è nella gran parte dei casi causata dall' *Escherichia coli* enterotossigeno, introdotto nell'organismo mediante cibi o bevande contaminate. Il rischio di incorrere in tale manifestazione è in funzione del paese nel quale ci si reca, toccando punte del 60% per quei paesi caratterizzati da condizioni igienico-sanitarie ridotte [78]. L'infezione gastrointestinale e la conseguente diarrea potrebbero essere alla base di una disbiosi nel lume intestinale che faciliterebbe la successiva colonizzazione e persistenza di ceppi resistenti [79].

Infatti, un recente studio ha dimostrato come, fra i viaggiatori che si sono recati nel subcontinente indiano, lo stato di portatore negli individui che non avevano presentato episodi di diarrea era del 23%, mentre raggiungeva valori del 47% in caso contrario [80].

Fra coloro che sono ricorsi all'uso di antibiotici per la gestione dell'infezione, i valori sono stati ancora più alti, arrivando a tassi di occorrenza dell'80% [80].

Probabilmente il loro uso, alterando il microbiota intestinale, ne compromette la capacità di resistere a nuovi intrusi [79,81].

Tale stato di portatore, dal momento del ritorno nel proprio paese di origine, tende a persistere solo per un breve periodo di tempo. Solo una percentuale variabile dal 5 al

35% è ancora positiva dopo 6 mesi [77,79,82,83,84]. Tuttavia, in questo relativamente breve arco temporale si può verificare una trasmissione intrafamiliare ed infine anche la possibilità che questi batteri resistenti raggiungano gli ospedali locali [79].

5.5 Ruolo dell'ambiente

La resistenza batterica che si osserva negli animali da produzione alimentare può diffondersi all'uomo non solo per via alimentare, ma anche attraverso vie quali l'acqua o altre contaminazioni ambientali che vanno a costituire un ulteriore e massivo reservoir.

L'*E. coli* è utilizzato come indicatore microbiologico di qualità delle acque. La sua presenza in tali habitat secondari è indice di inquinamento fecale, ma considerando l'occorrenza di resistenze multiple in tale specie, può fungere anche da vettore di resistenze sia in altri organismi superiori, mediante l'abbeveraggio di acqua o l'assunzione di cibi contaminati, soprattutto quelli consumati crudi o poco cotti, un po' come avviene per la diffusione di infezioni a trasmissione oro-fecale, sia ad altri microrganismi patogeni mediante trasferimento genico orizzontale, aumentando il rischio di incorrere poi in infezioni da microrganismi multi-resistenti difficilmente trattabili.

Quando si parla di resistenza ambientale, l'acqua, considerando l'importante e massivo utilizzo che se ne fa e il ricircolo a cui va incontro nell'ecosistema, gioca un ruolo chiave fungendo non solo da habitat ma anche da sistema di trasporto e diffusione per i microrganismi.

L'uso del letame come fertilizzante e le feci degli animali da pascolo giocano un ruolo nella diffusione di Enterobacteriaceae fecali ESBL positive nel suolo e successivamente nelle acque di superficie [65].

Anche gli animali selvatici, come gli uccelli, nelle cui feci si sono riscontrati anche batteri resistenti ad antibiotici comunemente usati a scopo medico e veterinario, sono non solo un indice del coinvolgimento ambientale, ma possono essi stessi poi contribuire all'ulteriore diffusione [85,86].

Tuttavia, il principale determinante della costituzione di tale reservoir sembrano essere le acque reflue provenienti da tutte le attività umane, da quelle domestiche a quelle industriali, urbane, commerciali e agricole.

Queste acque, fortemente inquinate, non solo dal punto di vista chimico-fisico ma anche microbiologico, sono un importante reservoir di microrganismi, anche potenzialmente patogeni, e di resistenze. In via teorica non dovrebbero giungere come tali nell'ecosistema, ma subire prima un processo di depurazione negli appositi impianti; tuttavia a livello globale secondo le stime dell'UNDP e dell'UN-Habits, quasi il 90% di tutte le acque di scarico vengono immesse nell'ambiente non trattate [87]. Questo riguarda soprattutto i paesi in via di sviluppo per la mancanza o disfunzione degli impianti di trattamento delle acque di scarico [87]. Anche particolari condizioni meteorologiche, quali piogge abbondanti e intense, possono causare uno straripamento delle acque reflue non ancora trattate nell'ambiente [86,88,89]. Inoltre, nonostante la notevole efficacia dei depuratori, in grado di abbattere oltre il 99% della carica microbica, la concentrazione di coliformi nelle acque post-trattamento può risultare ancora significativamente elevata [90].

La concentrazione di batteri negli effluenti dei depuratori è molto variabile, anche in conseguenza della tipologia di processi adoperati e dal tipo ed origine delle acque di scarico in arrivo all'impianto, con valori che tuttavia possono raggiungere anche le migliaia di cfu/ml di *Escherichia coli* [86,90,91].

Di queste migliaia di batteri su millilitro rilasciate dagli impianti, la percentuale di *Escherichia coli* resistenti, ed in particolare quelli con fenotipo ESBL, sono anch'essi

fortemente variabili, da paese a paese come anche, all'interno di uno stesso paese fra un impianto e l'altro, con valori che possono andare da meno dell'1% a valori del 18% o più [86,91,92].

Naturalmente, riversandosi poi nei fiumi, laghi o direttamente nei mari od oceani in base alla localizzazione geografica dell'impianto, subiranno un'ulteriore diluizione, solitamente di 2-3 ordini logaritmici in base 10 [86,91,93]. In base alla concentrazione microbica presente infine sulle acque di superficie, e sulla base delle normative vigenti in quel determinato stato, si baserà la possibilità o meno di poterle utilizzare a scopi ricreazionali. Ad ogni modo l'utilizzo di queste da parte dei bagnanti può essere considerata una potenziale fonte di esposizione a *E. coli* ESBL con successivo rischio di colonizzazione che si andrà a sommare alle altre vie descritte precedentemente quali quella alimentare e quella secondaria al contatto diretto od indiretto con animali o persone [86,94].

Questi batteri oltre a essere portatori di resistenze, possono in alcuni casi esprimere anche fattori di virulenza. Franz E. et al, in uno studio pubblicato nel 2015, hanno dimostrato come, fra gli *E. coli* ESBL positivi isolati dalle acque di superficie, ben il 6% era potenzialmente uropatogeno e un ulteriore 8,5% potenzialmente enteropatogeno, precisamente il 6,1% era enteroaggregante e il 2,4% enterotossigeno [95].

L'ingestione accidentale di acqua durante l'attività ricreazionale non pone solo un rischio di colonizzazione da parte di batteri resistenti, ma anche il rischio di incorrere in eventi infettivi, nella maggior parte dei casi caratterizzati da manifestazioni GI, senza però escludere la possibilità di interessamento di altri distretti, tra i quali quello urinario [88,96,97]. In particolare, il rischio di incorrere in infezioni GI sembra essere correlato al tipo di attività acquatica svolta e dalle attività meteorologiche che si sono sviluppate nei giorni o nelle ore precedenti. Infatti, il rischio è maggiore nel caso si siano verificate piogge intense nelle ore precedenti per via della maggiore concentrazione di

microrganismi che viene trasportata e si riversa in mare [88]. Per quanto concerne l'attività ludica svolta, gli sport come il surf, che comportano un maggiore contatto con l'acqua e un maggiore rischio di una sua ingestione, presentano un rischio relativo di incorrere in manifestazioni infettive maggiore rispetto a coloro che non entrano in acqua o che fanno attività che richiedono un ridotto contatto come il canottaggio [97].

6 Rilevanza clinica dell'antibiotico resistenza nelle infezioni umane

Sempre più frequentemente si stanno osservando infezioni da microrganismi resistenti sia in ambito ospedaliero che comunitario. Queste resistenze comportano non solo un ritardo nell'inizio di un trattamento appropriato, ma anche una difficoltà nell'eradicazione dell'infezione esitando, nel peggiore dei casi, nella morte [98].

L'aumento nella prevalenza di infezioni da microrganismi resistenti fa sì che molti antibiotici, precedentemente utilizzati come terapia empirica di prima linea per il trattamento di una specifica infezione, ora siano inefficaci, ricorrendo al trattamento con farmaci più recenti, più costosi, e spesso anche a più ampio spettro e che per questo dovrebbero essere riservati a condizioni più severe, o a farmaci di vecchia data, che erano stati superati per via dei loro effetti collaterali, ma che in alcuni casi oggi risultano l'unica terapia disponibile. Ne è un esempio la colistina che presenta numerosi effetti collaterali fra i quali la nefrotossicità che può portare ad insufficienza renale ma che in alcuni casi risulta essere l'unica opzione per il trattamento di infezioni ormai resistenti a qualsiasi altra molecola antibiotica [99].

Nonostante la scarsità di dati e la possibilità di attuare diversi approcci per determinare la mortalità causata da infezioni resistenti, rendendo di fatto questi numeri solo una sottostima della reale entità del problema [100], si ritiene che circa 700000 persone muoiano ogni anno per infezioni da batteri resistenti [101]. Se la corrente tendenza

riguardo la diffusione di tali infezioni e conseguente mortalità, come anche lo scarso investimento nella sintesi di nuovi antimicrobici, non subirà un'inversione di rotta, si stima che nel 2050 si possa arrivare a 10 milioni di decessi l'anno [101].

Bisogna inoltre tenere a mente che questa diffusione delle resistenze si ripercuote in numerosi altri ambiti sanitari come quello dei pazienti oncologici in trattamento chemioterapico dove la terapia antibiotica risulta fondamentale per evitare e combattere le infezioni, o negli interventi chirurgici, soprattutto quelli contaminati o sporchi, dove il buon outcome è determinato anche dalla profilassi antibiotica e dalla disponibilità di un'efficace terapia laddove si verificasse un'infezione [101].

Oltre al risvolto sanitario vi è anche quello economico, infatti le infezioni resistenti necessitano per il trattamento di costi maggiori e i pazienti spesso richiedono un'ospedalizzazione di maggiore durata [102].

Nei paesi in via di sviluppo del sud dell'Asia la massiva prevalenza di resistenze nei confronti dell'ampicillina come anche degli aminoglicosidi e delle cefalosporine di 3° generazione ha portato all'uso dei carbapenemici come terapia di prima linea nel trattamento delle sepsi neonatali. Questo a sua volta sta portando alla preoccupante emergenza di Enterobacteriaceae panresistenti, associate ad un'alta mortalità neonatale. Più della metà dei neonati con sepsi da batteri ESBL positivi rischia di morire, rispetto al 25% di quelli con infezioni ESBL sensibili e ogni anno solo in India muoiono più di 60000 neonati per infezioni da *E. coli* ESBL e da MRSA [103].

Nei paesi ad alto reddito come quelli della comunità europea, nonostante ci sia una certa differenza fra le singole nazioni, i numeri sono molto più bassi, seppur anch'essi sottostimati. Solo nel 2015 il numero di infezioni batteriche antibiotico-resistenti è stato di oltre 670000, e approssimativamente 33000 persone sono decedute come diretta conseguenza di quest'ultime [104].

Di queste quasi 300000 infezioni sono state causate dall' *E. coli* resistente alle cefalosporine di 3° generazione causando circa 9000 decessi, il 27% del totale. Tale resistenza è inoltre mediata, nell'88,6% dei casi, dalla codificazione e produzione di beta-lattamasi a spettro esteso [104].

Rapportando il numero complessivo dei casi e dei decessi non sulla base dell'agente eziologico ma sulla distribuzione geografica, per ambedue circa un terzo si è riscontrato in Italia, posizionandosi dunque al primo posto fra i paesi della comunità europea. Dato estremamente importante inoltre è quello temporale, sulla base del quale si valutano l'efficacia dei programmi e le politiche intraprese fino a questo momento per la gestione del problema e si progettano le future [104].

Valutando il trend dal 2007 al 2015 il numero di morti complessive da batteri resistenti a livello europeo è raddoppiato e quelle causate da *Escherichia coli* resistenti alle cefalosporine di 3° generazione ben quadruplicato [104].

Da questi dati si può osservare come ulteriori sforzi siano necessari per arginare il problema e come, in un mondo sempre più globalizzato e interconnesso e dove ogni singola attività umana non rimane svincolata dalle altre, ma si influenzano e interagiscono in maniera interdipendente, tali impegni devono essere intrapresi in sinergia, a livello globale, seppur poi elaborati su misura in base alle necessità e problematiche specifiche di ogni paese.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Obiettivo di questo studio è quello di descrivere i pattern di resistenza agli antibiotici espressi a livello fenotipico in isolati di *Escherichia coli* provenienti dalla matrice umana, animale ed ambientale, e di valutare la distribuzione degli elementi genetici mobili di resistenza nelle diverse matrici.

Si è inoltre indagata l'associazione tra l'isolamento di *E. coli* ESBL di provenienza umana e selezionate caratteristiche socio-demografiche e cliniche dei pazienti.

METODOLOGIA

Il progetto ha previsto diverse componenti tra cui la valutazione dei pattern di resistenza agli antibiotici di isolati umani e provenienti da matrice animale/ambientale e la successiva analisi molecolare dei meccanismi di resistenza.

Si è poi proceduto ad uno studio caso-controllo per valutare l'associazione tra l'isolamento di *E. coli* ESBL e la presenza di patologie e selezionate condizioni socio-economiche.

Analisi dell'antibiotico-resistenza

Analisi fenotipica

Sono stati analizzati isolati di *E. coli* provenienti da differenti fonti. Questo è stato permesso anche grazie alla collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, che si è occupato dell'isolamento di ceppi di *E. coli* di origine zootecnica, provenienti dalla filiera avicola. L'isolamento batterico dei ceppi di origine zootecnica è stato effettuato su organi provenienti da animali con quadri di enteriti emorragiche e quadri setticemici. Gli isolati di *E. coli* provenienti dalla filiera avicola sono stati ottenuti anche mediante tamponi cloacali. Sono stati, inoltre, prelevati campioni dalla filiera suinicola, bovina e di origine ambientale, provenienti da acqua marina campionata dalle zone costiere marchigiane particolarmente soggette a contaminazioni fecali.

I campioni di *E. coli* in ambito umano sono stati raccolti durante il periodo di sorveglianza dal 1° febbraio al 30 settembre 2018 in pazienti ricoverati o ammessi presso le SOD dell'AOU Ospedali Riuniti di Ancona e sono stati suddivisi in campioni comunitari o nosocomiali.

Sono stati inclusi nei casi nosocomiali tutti quei soggetti ai quali era stata effettuata la raccolta del campione urinario dal terzo giorno di ospedalizzazione o che erano stati dimessi nei 30 giorni precedenti il ricovero preso in esame. Coloro che non rientravano in questi parametri sono stati inseriti nei casi comunitari.

Gli *E. coli* sono stati isolati dalla SOS Microbiologia del Laboratorio Analisi che ne ha valutato i profili di resistenza fenotipica.

Gli antibiotici utilizzati per valutare il profilo di resistenza sono stati: amoxicillina + acido clavulanico, piperacillina + tazobactam, imipenem, meropenem, ertapenem, cefotaxime, cefepime, amikacina, gentamicina, norfloxacin, ciprofloxacina, trimetoprim + sulfametossazolo e la fosfomicina. Tali profili di resistenza sono stati determinati sulla base della seconda versione dell'EUCAST (European committee on antimicrobial susceptibility testing) Clinical Breakpoint.

Le abbreviazioni utilizzate nel testo sono sintetizzate nella seguente tabella:

AMC	Amoxicillin + Clavulanic Acid
TZP	Piperacillin + Tazobactam
IPM	Imipenem
MEM	Meropenem
ETP	Ertapenem
CTX	Cefotaxime
FEP	Cefepime
AN	Amikacin
GM	Gentamicin
NOR	Norfloxacin
CIP	Ciprofloxacin
SXT	Trimethoprim + Sulfamethoxazole
FOS	Fosfomycin

Analisi molecolare

Gli isolati di *E. coli* provenienti dalle varie matrici sono stati quindi seminati per un arricchimento sul terreno di coltura Agar Columbia supplementato con una soluzione al 5% di sangue defibrinato di montone.

Ottenuta la crescita batterica dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore si è proceduti alla lisi batterica in acqua sterile, priva di RNasi, DNasi e proteasi per il recupero del materiale genetico attraverso la bollitura a bagnomaria (100°C per 10 minuti). Dopo centrifugazione è stato recuperato in un'altra provetta da 1,5 ml il surnatante contenente il materiale genetico, sottoposto a procedura PBRT (PCR based replicon typing) (Figura 1).

Il kit PBRT 2.0 (Diatheva, Cartoceto-PU) utilizzato consente di effettuare una tipizzazione molecolare dei principali plasmidi responsabili della resistenza antibiotica nella famiglia delle Enterobacteriaceae.

Tale metodica permette di identificare 30 repliconi, attraverso 8 multiplex PCR, amplificando specifiche sequenze del plasmide coinvolte nel controllo della replicazione e caratteristiche di uno specifico gruppo di incompatibilità (Inc. group).

I repliconi identificabili sono: HI1, HI2, I1, I2, X1, X2, X3, X4, L, M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIC, FIB KN, FIB KQ, W, Y, P1, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M, FIB-M.

Nella piastra PCR da 96 pozzetti oltre al DNA, al controllo positivo e negativo sono state aggiunte 8 miscele di reazione contenenti ognuna i primers specifici come mostrato in figura 3.

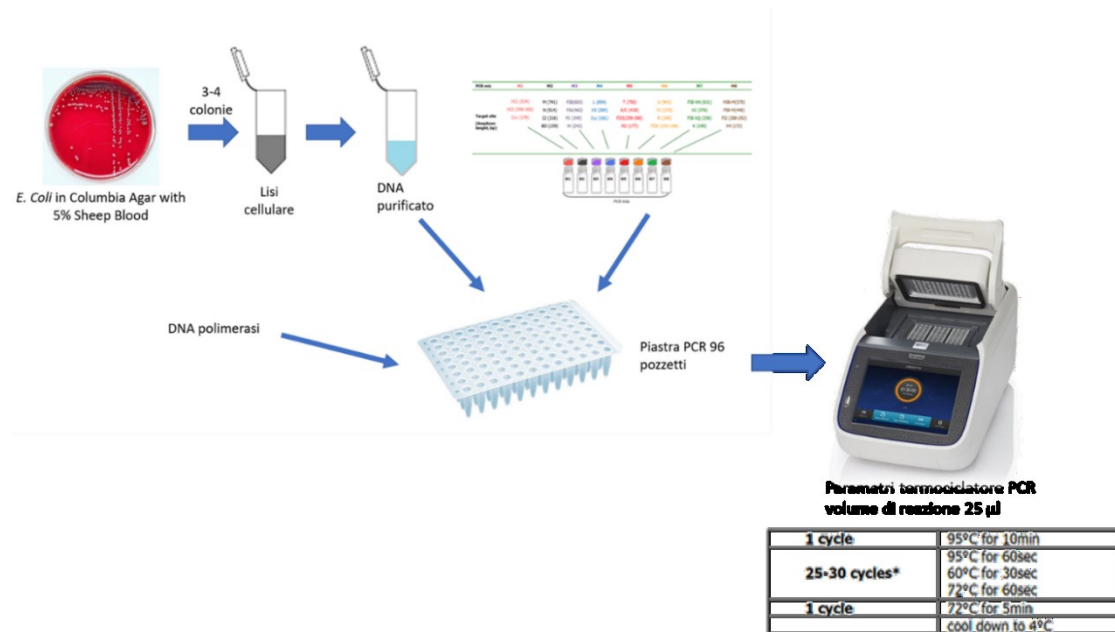


Figura 3. Schema illustrativo protocollo PBRT

Gli ampliconi ottenuti sono stati poi analizzati con lo strumento AATI Fragment Analyzer (Advanced Analytical) (Figura 4). Tale strumento permette di analizzare i prodotti della PCR sfruttando un sistema di elettroforesi capillare automatico, dotato di elevata accuratezza e risoluzione.

L'applicazione di una differenza di potenziale alle due estremità del capillare determina una migrazione dei frammenti di DNA, tanto più rapida quanto più piccolo sarà il frammento. Una volta raggiunta l'estremità positiva del capillare, questo verrà colpito da una luce laser, che determinerà l'emissione di una fluorescenza, rilevata da un apposito dispositivo, e la cui intensità verrà digitalizzata, codificata in base al colore e riportata come picco in un elettroferogramma.

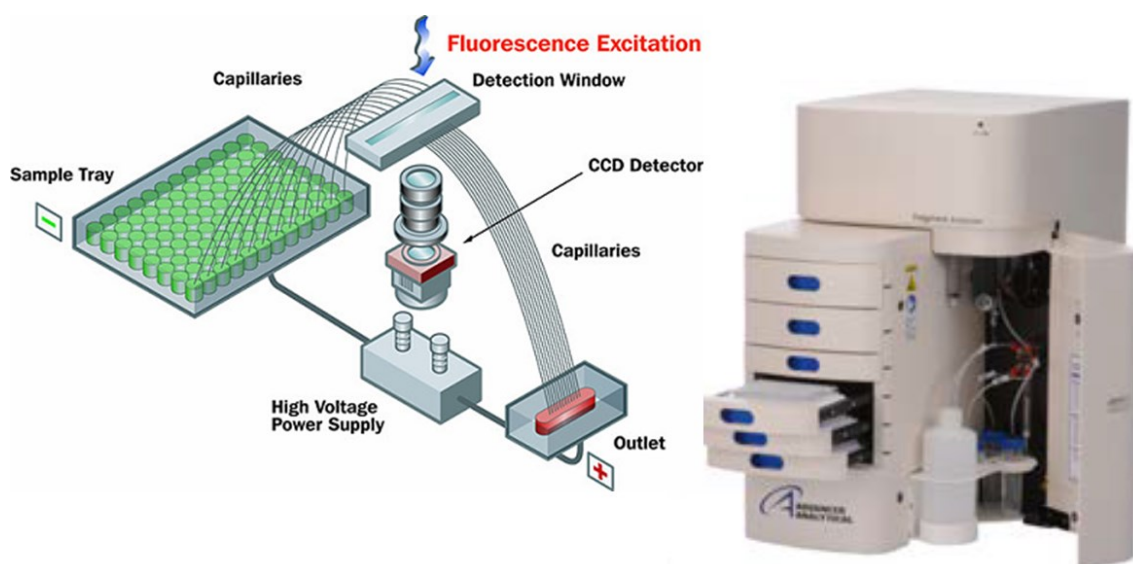


Figura 4. Struttura e funzionamento AATI Fragment Analyzer.

Sulla base del tempo impiegato per arrivare all'estremità del capillare si può risalire alla sua dimensione, grazie al confronto con un DNA ladder da 100 bp di riferimento. L'elaborazione dei dati e la calibrazione dei risultati in base alla scala del DNA ladder viene eseguita da un software di analisi dedicato, il PROSIZE 3.0.

Tramite questo software, dopo aver eseguito la calibrazione del ladder, è possibile visualizzare i risultati espressi attraverso dei grafici. È possibile visualizzare contemporaneamente 5 cromatogrammi, corrispondenti ai pozzetti in cui erano stati caricati i vari prodotti della PBRT ottenuti da un isolato di *E. coli*, che riportano il nome del replicone corrispondente ad ogni picco. Conoscendo infatti la dimensione del frammento e basandosi sul fatto che ampliconi differenti hanno anche lunghezze differenti, è possibile risalire al replicone da cui è stato ottenuto. Sempre nella stessa schermata, sulla destra, i dati sono riassunti in una tabella e grazie ad un plugin dedicato all'analisi PBRT è possibile in maniera diretta visualizzare i positivi in quanto in corrispondenza della positività le caselle risulteranno verdi (Figura 5).

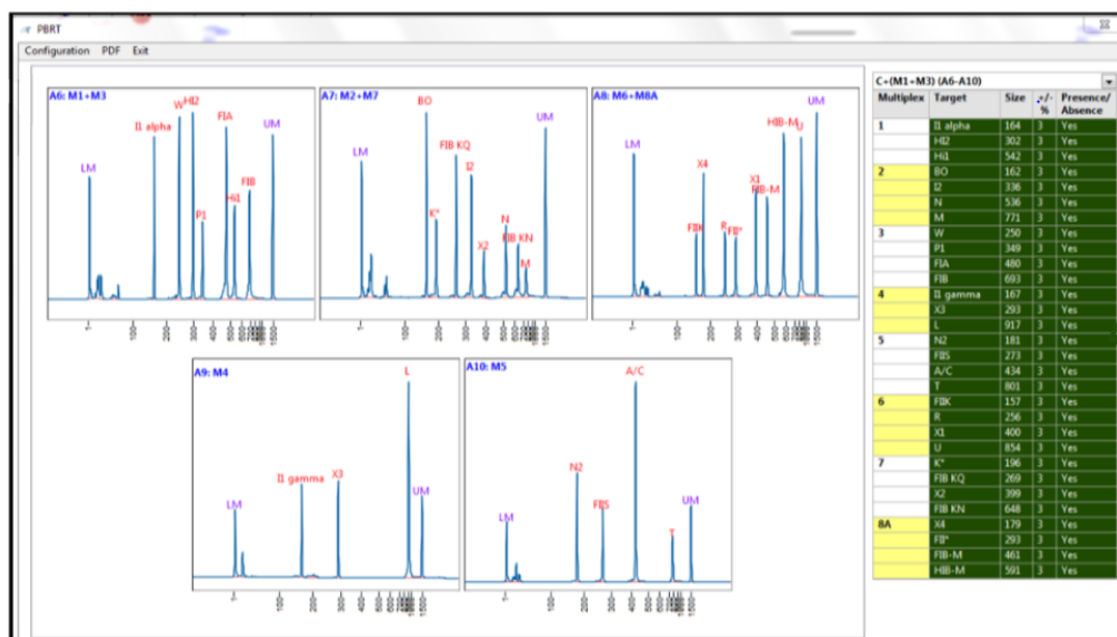


Figura 5. Schermata di visualizzazione di 5 cromatogrammi e della tabella con l'elenco dei target riscontrati.

Analisi Epidemiologica

È stato condotto uno studio caso-controllo sulle variabili sociodemografiche e cliniche relative ai 47 pazienti dai quali provenivano i ceppi analizzati (casi), confrontati con un numero doppio (n=94) di pazienti da cui non erano stati isolati microrganismi multiresistenti (controlli).

Le condizioni indagate sono state:

- una storia di malattia renale cronica, a qualunque stadio, od un episodio di malattia renale acuta;
- uno stato di sepsi o shock settico o setticemia;
- la presenza di diabete mellito;
- un episodio di polmonite/altro evento infettivo durante il ricovero o come causa del ricovero;
- la presenza di comorbidità neurologica;

- la presenza di patologie cardiovascolari.

I dati sono stati estratti dal database delle Schede di dimissione ospedaliera.

Tutti i dati sono stati trattati in forma anonima, utilizzando quale identificativo il codice nosografico attribuito all'atto del ricovero.

Al fine di valutare le variabili associate all'isolamento di *E. coli* ESBL nella matrice umana è stato costruito un modello di regressione logistica con metodo backward che prevede la progressiva eliminazione di variabili non in grado di migliorare la spiegazione della variabilità del fenomeno ma teoricamente rilevanti o tendenzialmente associate all'analisi bivariata (con $p < 0.40$).

Le analisi sono state condotte con il software STATA, il livello di significatività è stato fissato a 0.05.

RISULTATI

47 campioni urinari provenienti da pazienti ricoverati in diverse SOD dell'azienda ospedaliera Ospedali Riunti di Ancona sono stati sottoposti ad analisi microbiologica per valutare la presenza di *E. coli* ESBL.

Sono stati, inoltre, processati complessivamente 173 campioni microbiologici da matrice animale (avicoli, bovini) ed alimentare (Panna UHT e panna non pastorizzata).

Analisi microbiologica

La distribuzione dei pattern di resistenza fenotipica ha evidenziato una relativamente frequente resistenza in isolati di pollo; più marcata e diffusa risulta essere la resistenza a livello umano (figura 6).

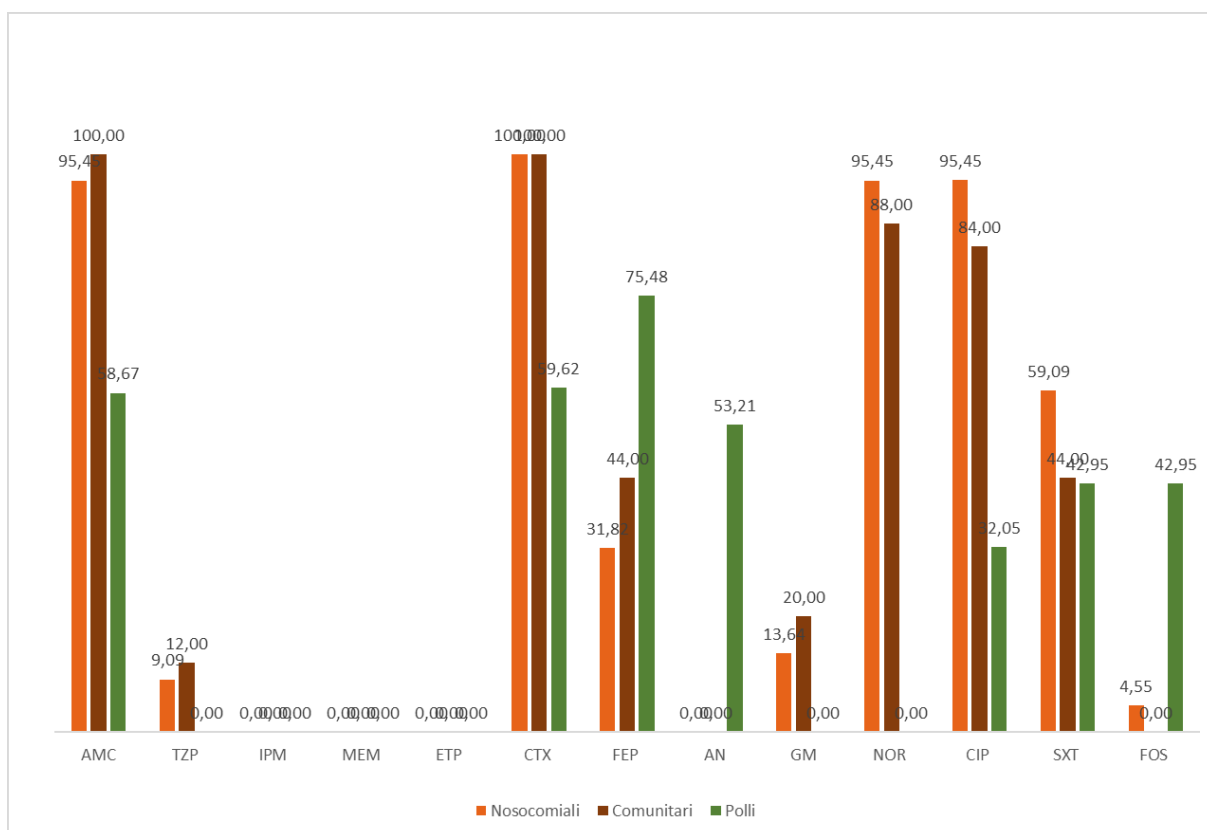


Figura 6. Distribuzione delle resistenze a specifici antibiotici in isolati provenienti da diverse matrici.

La analisi microbiologica ha quindi rilevato una differente distribuzione di filograppo tra ceppi di origine animale ed umana (figura 7).

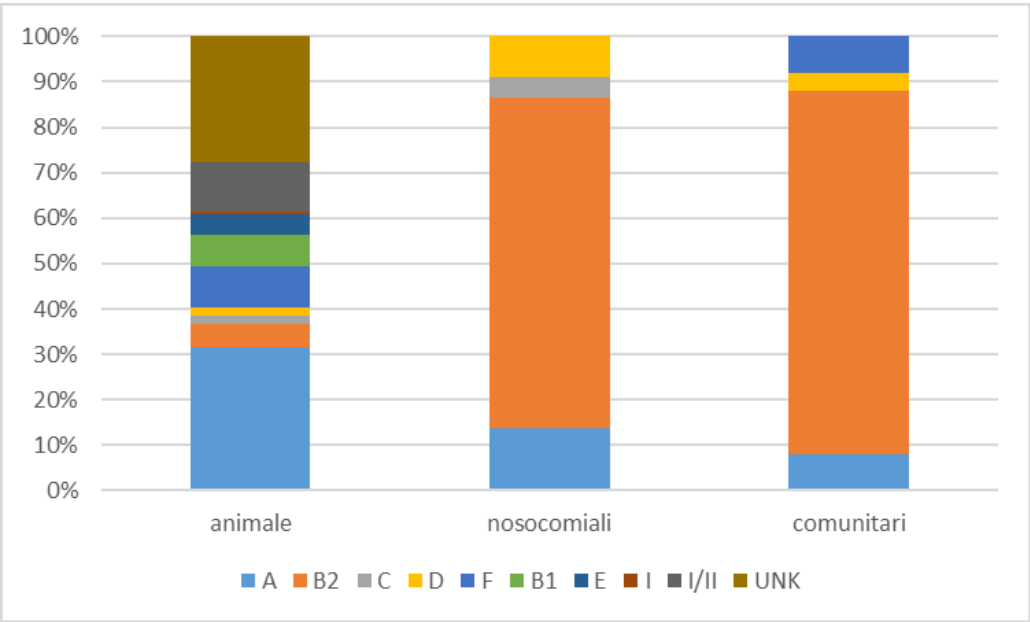


Figura 7. Distribuzione dei filograppi in campioni di *E. coli* ESBL provenienti da matrice umana e animale.

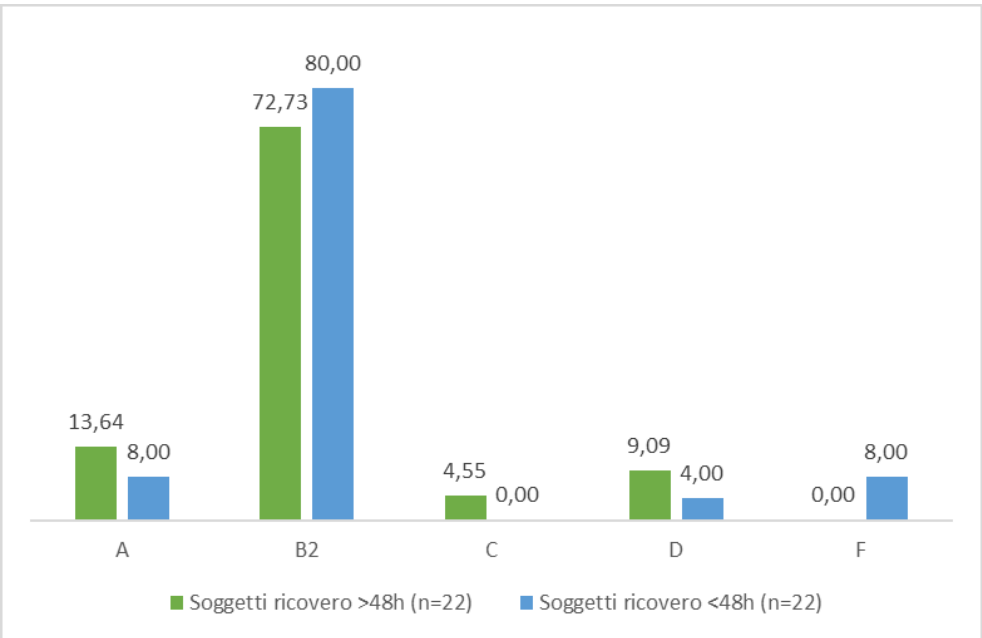


Figura 8. Analisi comparativa dei filograppi rilevati dai ceppi di *E. coli* ESBL, cefalosporinasi isolati da campioni urinari in soggetti ricoverati (soggetti ricovero >48h

– n=22) ed in soggetti in cui il prelievo è stato eseguito entro 48 h da inizio degenza (soggetti ricovero < 48h – n=25).

Il grafico sottostante mostra il sostanziale parallelismo tra i geni di resistenza presenti negli isolati umani; che presentano invece alcune differenze rispetto a quelli animali.

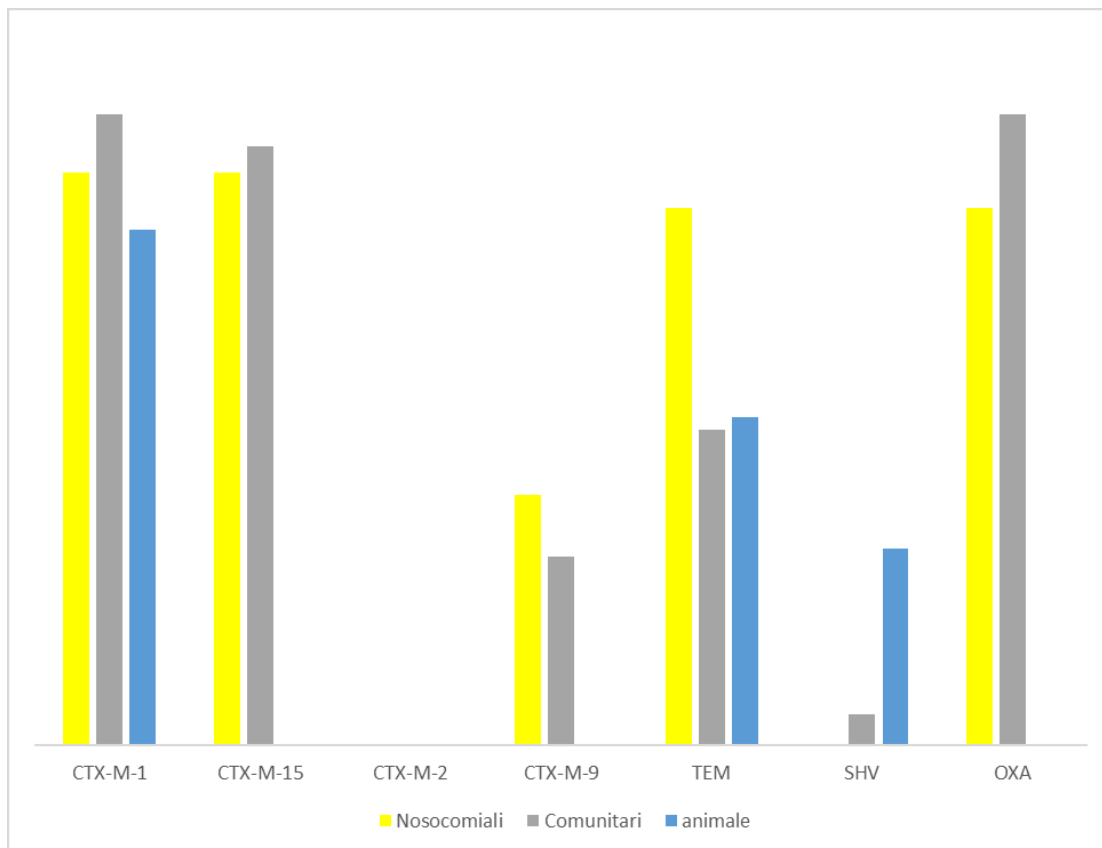


Figura 9. Analisi comparativa dei geni ESBL rilevati dai ceppi di *E. coli* ESBL, cefalosporinasi isolati da campioni da matrice animale, e da campioni urinari in soggetti ricoverati (soggetti ricovero >48h - n=22) e in soggetti in cui il prelievo è stato eseguito entro 48 h da inizio degenza (Soggetti ricovero <48h - n=25).

Sono stati quindi analizzati i profili PBRT degli isolati. La figura 10 mostra la grande varietà di repliconi identificati nelle diverse matrici, evidenziando nuovamente una evidente differenza nelle popolazioni provenienti da matrici diverse e la similitudine nei ceppi di origine umana (con ricchezza maggiore nei campioni comunitari).

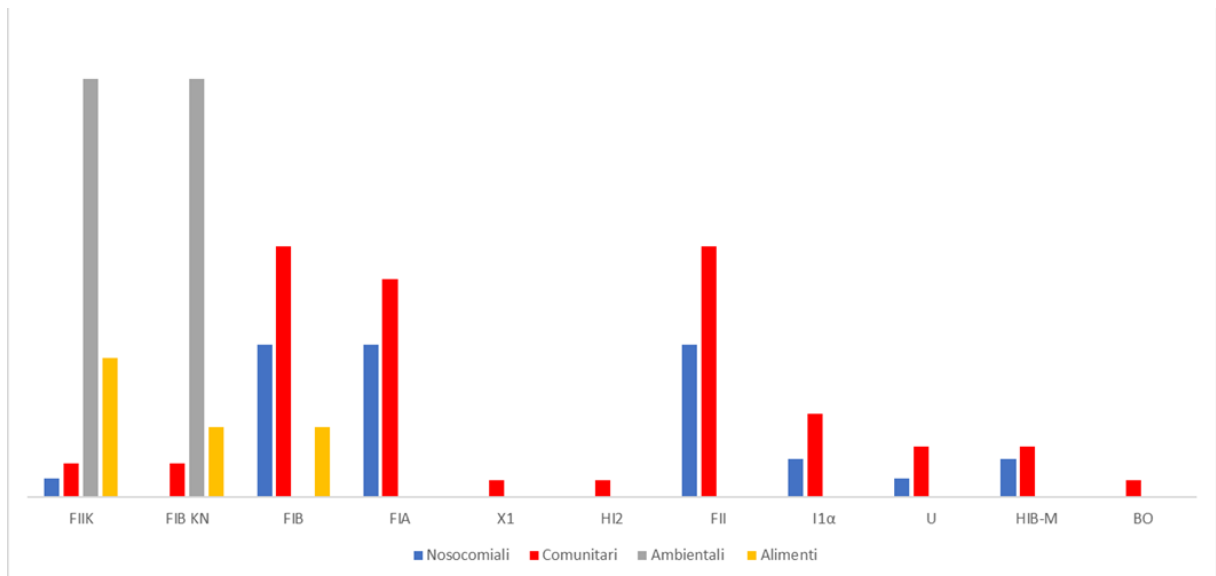


Figura 10. Analisi comparativa tra i singoli repliconi riscontrati nei ceppi analizzati di *E. coli* ESBL, cefalosporinasi isolati da campioni urinari in soggetti ricoverati (soggetti ricovero > 48h – n=22) ed in soggetti in cui il prelievo è stato eseguito entro 48 h da inizio degenza (soggetti ricovero <48h – n=25).

La figura sottostante, analoga alla precedente, evidenzia la similitudine tra i campioni ambientali e la matrice alimentare.

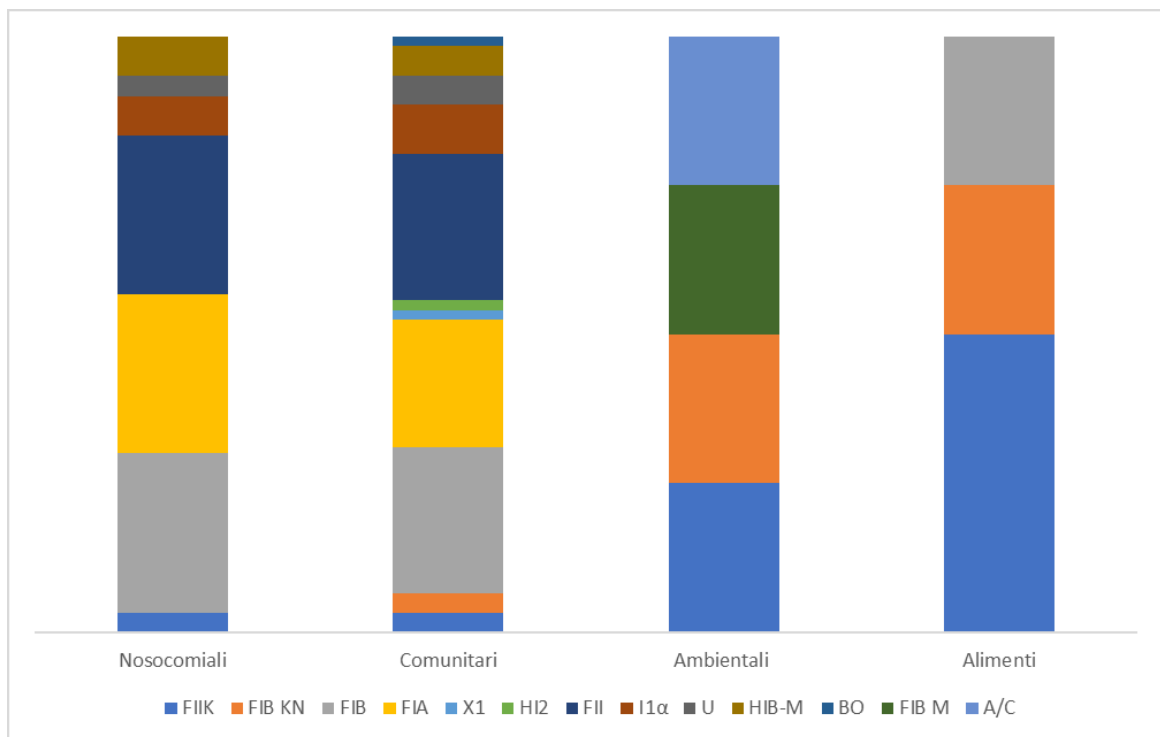


Figura 11. Analisi comparativa tra i singoli repliconi riscontrati nei ceppi analizzati di *E. coli* ESBL, cefalosporinasi isolati da campioni urinari in soggetti ricoverati (soggetti ricovero > 48h – n=22) ed in soggetti in cui il prelievo è stato eseguito entro 48 h da inizio degenza (soggetti ricovero <48h – n=25).

Analisi epidemiologica

Relativamente all'analisi epidemiologica, attraverso il confronto tra i casi di pazienti con isolamento di *E. coli* ESBL vs i pazienti senza isolamento noto, è stato possibile evidenziare l'importanza dell'età avanzata (OR 1.61, IC95% 1.1-2.38), della presenza di comorbidità quali le patologie tumorali (OR 4.88, IC95% 1.60-14.91), le patologie neurologiche (OR 4.91, IC95% 1.09-22.06) e le patologie urinarie (OR 7.64, IC95% 2.25-25.95) quali fattori di rischio di un interessamento della via urinaria da parte degli *E. coli* ESBL.

Logistic regression

Number of obs = 135

LR chi2(9) = 36.74

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -64.516842

Pseudo R2 = 0.2216

caso	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
cl_eta	1.616611	.3197086	2.43	0.015	1.097154	2.382007
tumori	4.879076	2.782308	2.78	0.005	1.595649	14.91894
snc	4.911672	3.764852	2.08	0.038	1.093387	22.06404
ipert	2.224019	1.165939	1.52	0.127	.7959706	6.214124
infettive_~a	1.209183	1.196666	0.19	0.848	.1738208	8.411673
sessu F	.871758	.3717181	-0.32	0.748	.3779577	2.010707
res.za Città	.4921032	.2481923	-1.41	0.160	.1831271	1.322391
Com. urin.	7.638492	4.766628	3.26	0.001	2.248198	25.95259

DISCUSSIONE

In questo elaborato è stata studiata la prevalenza e la relazione genetica di isolati di *E. coli* provenienti da varie matrici nell'ambito di un approccio "One Health". Oltre che negli isolati di matrice umana, ceppi di *E. coli* ESBL sono stati riscontrati in oltre il 50% dei campioni provenienti da pollame, ed in misura molto minore da altre matrici. Questo dato del 50% è leggermente inferiore a quanto riportato nel report scientifico dell'EFSA e dell'ECDC riguardo ai dati italiani [52]. Il confronto degli *E. coli* ESBL provenienti da diverse matrici è avvenuto su più livelli.

Sono stati confrontati i filogruppi di campioni provenienti da matrice umana, distinta in nosocomiale e comunitaria, e da matrice animale.

È possibile osservare una notevole sovrapposizione fra i filogruppi individuati nei soggetti nosocomiali e comunitari. In entrambi il filogruppo predominante è risultato essere il B2, presente in una percentuale superiore al 70%. Negli animali il filogruppo B2 è invece stato riscontrato in una percentuale minoritaria di casi. Inoltre, negli animali, rispetto all'uomo, è possibile osservare una maggiore varietà di filogruppi e quelli più rappresentati risultano essere l'A e l'UNK. Al contrario del filogruppo A, rilevato anche nell'uomo, quello UNK è stato osservato solo nell'animale. La differenza tra le popolazioni di *E. coli* associate a patologia umana e animale suggerisce come la matrice animale non sia una fonte diretta di patogeni umani.

Nel parlare però di antibiotico-resistenza, e ricordando la capacità di trasferimento genico orizzontale, è fondamentale indagare se la resistenza batterica presente negli animali, nell'ambiente e negli alimenti sia simile a quella identificata negli *E. coli* ESBL isolati nell'uomo. Una sovrapposizione infatti identificherebbe gli animali, l'ambiente e gli alimenti come potenziali vie di disseminazione di resistenze antibiotiche negli *E. coli* identificati a livello umano.

Tale caratteristica è stata indagata con due metodi. Nel primo si sono confrontati i repliconi, ricercati a livello ambientale, alimentare e umano – quest'ultimo sempre distinto in soggetti comunitari e soggetti nosocomiali.

Nell'uomo la varietà di repliconi identificata è stata maggiore e quelli riscontrati più frequentemente sono stati i repliconi FIB, FIA, FII. Negli animali e negli alimenti invece la variabilità dei repliconi è stata minore e fra quelli riscontrati vi sono: FIB-NK, FIIK, FIB-M e A/C riscontrati solo raramente o non riscontrati a livello umano. Fra i plasmidi riscontrati più frequentemente a livello umano solo FIB è stato riscontrato in maniera significativa nelle altre matrici, per la precisione in quella alimentare.

È quindi poco probabile che i plasmidi responsabili della resistenza presenti a livello degli *E. coli* isolati dall'uomo siano stati acquisiti dall'ambiente o dagli alimenti con l'eccezione dei plasmidi appartenenti al gruppo di incompatibilità FIB che potrebbero aver svolto un ruolo, seppur parziale, nella diffusione delle resistenze all'uomo per via alimentare.

Mediante il secondo metodo si sono andati a confrontare i geni alla base della resistenza ESBL presente nei campioni umani e animali.

Sebbene negli isolati di *E. coli* di provenienza umana si possa notare una maggiore varietà di geni ESBL, si può osservare un certo grado di sovrapposizione fra quelli identificati a livello animale e quelli identificati a livello umano seppur con delle differenze. La difformità più sostanziale riguarda la famiglia dei geni di resistenza SHV, presente nell'animale, ma scarsamente rappresentata nell'uomo. Tale riscontro è una dimostrazione del fatto che possa essersi verificata una trasmissione di geni di resistenza, anche se è difficile determinarne la direzione di diffusione, che potrebbe essere dall'animale all'uomo, ma anche dall'uomo all'animale.

Tuttavia, la contaminazione dall'uomo all'animale prevederebbe una via di disseminazione che potrebbe essere basata ad esempio sull'acqua, o sul mangime –

vie che almeno nel nostro territorio risultano poco probabili. Osservando invece la similitudine di repliconi fra la matrice ambientale e alimentare, è più plausibile considerare che la disseminazione, attraverso queste 2 vie, si sia verificata dall'animale all'uomo. Bisogna però precisare che la determinazione dei geni ESBL, da sola, non è sufficiente per poter parlare di un coinvolgimento animale indiretto nella disseminazione di tale resistenza all'uomo in particolar modo se, dalle altre 2 indagini basate sul confronto fra i repliconi ed i filogruppi di origine umana e non umana, si osserva una scarsa concordanza.

Questa divergenza potrebbe essere spiegata da un'altra potenziale via di trasmissione orizzontale delle resistenze e cioè quella basata sugli elementi genetici trasponibili. Quest'ultimi presentano spesso geni che codificano per fattori di virulenza e di resistenza e in alcuni casi sono in grado di trasferirsi anch'essi da un microrganismo ad un altro mediante coniugazione.

Non avendo indagato in questo studio il potenziale ruolo dei trasposoni, quest'ultima nota rimane una pura speculazione.

CONCLUSIONI

La prevalenza delle infezioni da *E. coli* resistente alle cefalosporine di 3° generazione ha mostrato un marcato aumento dall'inizio degli anni 2000, in associazione all'emergenza ed alla diffusione globale di *E. coli* che producono beta-lattamasi a spettro esteso. Infezioni causate da questi batteri sono associate ad un eccesso di morbosità, mortalità e prolungamento della degenza ospedaliera portando a costi sanitari più elevati rispetto alle infezioni causate da ceppi sensibili.

Una comprensione dei serbatoi e delle fonti critiche per l'acquisizione umana di questi microrganismi resistenti o dei loro geni di antibiotico-resistenza è un interesse sempre crescente dal punto di vista della Sanità Pubblica.

L'analisi a livello molecolare ha permesso di rilevare, almeno in questo contesto, risultati parzialmente rassicuranti circa la mancata evidenza di un linkage diretto di diffusione di microrganismi resistenti, allargando le ipotesi al ruolo dell'ambiente quale mediatore di diffusione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] W.H.O One Health; 9 Novembre 2017; on-line all'url <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/one-health> (ultima consultazione 05/2020).
- [2] Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Tanner M. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Prev Vet Med.* 2011;101(3–4):148–56.
- [3] Wildlife Conservation Society. Conference Summary. One World One Health: Building Interdisciplinary Bridges to Health and Globalized World. The Rockefeller University: New York, NY. 2004 september 29. Disponibile sul sito: <http://www.oneworldonehealth.org>
- [4] Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. Risk factor for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1411):983-989.
- [5] Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016 Aug 5;110(7):377–80.
- [6] One Health Commission; on-line all'url <https://www.onehealthcommission.org/> (ultima consultazione 05/2020)
- [7] Osofsky, S.A., Cleaveland, S., Karesh, W.B., Kock, M.D., Nyhus, P.J., Starr, L. and Yang, A. (Eds). (2005). Conservation and Development Interventions at the Wildlife/Livestock Interface: Implications for Wildlife, Livestock and Human Health. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. xxxiii + 220pp.
- [8] Gibbs EPJ. The evolution of One Health: A decade of progress and challenges for the future. *Vet Rec.* 2014;174:85–91
- [9] CDC, One Health Basic, History; on-line all'url: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history> (ultima consultazione 05/2020)

- [10] FAO, OIE, WHO, UN System Influenza Coordination, UNICEF and WORLD BANK. Contributing to One World, One Health. A Strategic Framework for Reducing Risk of Infectious Disease at Animal-Human-Ecosystem Interface. 2008 October 14 pp. 68.
- [11] La Placa M. I farmaci antibatterici. In: Principi di microbiologia medica. XIV edizione. Napoli: EdiSES: Esculapio; 2014: 150-168.
- [12] Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini GM. Farmaci antibatterici. In: Principi di MICROBIOLOGIA MEDICA. 2 edizione. Rozzano: Casa Editrice Ambrosiana; 2012:140-158
- [13] Di Carlo R. Macrolidi, Chetolidi, Lincosamidi, Streptogramine e Oxazolidinoni. In: Annunziato L, Di Renzo G et al. Trattato di Farmacologia. Volume 2. Napoli: Idelson-Gnocchi 2010:1318-1328.
- [14] De Marino V. Betalattamine. In: Annunziato L, Di Renzo G et al. Trattato di Farmacologia. Volume. Napoli: 2 Idelson-Gnocchi 2010:1290-1307
- [15] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010;54(3):969-76
- [16] Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini GM. Genetica batterica. In: Principi di MICROBIOLOGIA MEDICA. 2 edizione. Rozzano: Casa Editrice Ambrosiana; 2012:39-56.
- [17] Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, Winkler ME. How Bacteria Become Resistant to Antibiotics. In: BACTERIAL PATHOGENESIS A Molecular Approach. 3 edizione. Washington D.C. : ASM Press; 2011: 347-372.
- [18] Sherley M, Gordon DM, Collignon PJ. Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. Plasmid. 2003;49(1):79–85.
- [19] Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, Winkler ME. Mechanisms of Genetic Modification and Exchange: Role in Pathogen Evolution. In: BACTERIAL

PATHOGENESIS A Molecular Approach. 3 edizione. Washington D.C. : ASM Press; 2011: 111-129.

[20] Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev.* 1987;51(4):381–95.

[21] Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and Classification of Bacterial Plasmids. *Microbiological Reviews.* 1998; 52(3): 375-395.

[22] La Placa M. Enterobatteri. In: *Principi di microbiologia medica*. XIV edizione. Napoli: EdiSES: Esculapio; 2014: 252-275.

[23] Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini GM. Enterobacteriaceae. In: *Principi di MICROBIOLOGIA MEDICA*. 2th ed. Rozzano: Casa Editrice Ambrosiana; 2012:211-229

[24] Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes.* 2012;3(2):71–87.

[25] Sokal A, Sauvanet A, Fantin B, de Lastours V. Acute cholangitis: Diagnosis and management. *J Visc Surg.* 2019;156(6):515–25.

[26] Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 2003;5(5):449–56.

[27] European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.

[28] Bush k. Past and Present Perspectives on β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(10):e01076-18.

[29] Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161–182.

[30] Luzzaro F, Gesu G, Pagani L, Rossolini GM. Diagnostica delle β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) nelle Enterobacteriaceae: problemi e raccomandazioni nella realtà epidemiologica italiana. *Microbiol Medica.* 2007;22(4):281–290

- [31] Powers JH. Antimicrobial drug development - the past, the present, and the future. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(4):23–31
- [32] Bradford PA. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-951
- [33] Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1):1–14.
- [34] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):165–74.
- [35] Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:33–41.
- [36] Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G, et al. Occurrence of Extended-Spectrum β -lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae in Italy: Implication for Resistance to β -Lactams and Other Antimicrobial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(1):196-202.
- [37] Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, et al. Trends in Production of Extended-Spectrum β -Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1659-64.
- [38] Giani T, Antonelli A, Caltagirone M, Mauri C, Nicchi J, Arena F, et al. Evolving beta-lactamase epidemiology in Enterobacteriaceae from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Euro Surveillance.* 2017;22(31):1-11.
- [39] European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.

- [40] D'Costa VM, King CE, Kalan L. et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011; 477: 457-61.
- [41] Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*. 2009;11(12):2970–88.
- [42] Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2009;276(1667):2521–30.
- [43] Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut*. 2009;157(11):2893–2902.
- [44] Martinez JL, Baquero F. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(7): 1771-1777
- [45] Vincent JL, Bassetti M, François B, Karam G, Chastre J, Torres A, et al. Advances in antibiotic therapy in the critically ill. *Crit Care*. 2016;20(1):133.
- [46] ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), and EMA (European Medicines Agency), 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 – Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA Journal* 2017;15(7):4872, 135 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4872
- [47] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2019.
- [48] European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2019. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017. Trends from 2010 to 2017. Ema/294674/2019.
- [49] McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clin Infect Dis*. 2002; 34(3): S93-S106

- [50] FAO, Wall BA, Mateus A, Marshall L, Pfeiffer DU. Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production. 2016.
- [51] Castanon JIR. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult Sci*. 2007;86(11):2466–2471.
- [52] EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2020. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal* 2020;18(3):6007, 166 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>
- [53] Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*. 2014;7:167–176.
- [54] Blanco N, O'Hara LM, Harris AD. Transmission pathways of multidrug-resistant organisms in the hospital setting: a scoping review. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2019;40(4):447–456.
- [55] Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of Acquiring Antibiotic-Resistant Bacteria From Prior Room Occupants. *Arch Intern Med*. 2006;166(18):1945–1951.
- [56] Mitchell BG, Digney W, Ferguson JK. Prior room occupancy increases risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition. *Healthc Infect*. 2014;19(4):135–140.
- [57] Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20: 1–55
- [58] Dohmen W, Bonten MJM, Bos MEH, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, et al. Carriage of extended-spectrum β -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(10):917–923.

- [59] Dahms C, Hübner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS One*. 2015;10(11):1–13.
- [60] Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, et al. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. Vol. 6, Antibiotics. 2017; 6(2):1–38 p.
- [61] Alexander TW, Inglis GD, Yanke LJ, Topp E, Read RR, Reuter T, et al. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. *Int J Food Microbiol*. 2010;137(1):40–48.
- [62] Müller A, Jansen W, Grabowski NT, Monecke S, Ehricht R, Kehrenberg C. ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int J Food Microbiol*. 2018;283:52–58.
- [63] Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, et al. Extended-Spectrum β -lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1216–1222.
- [64] Li C, Chen J, Wang J, Ma Z, Han P, Luan Y, et al. Occurrence of antibiotics in soils and manures from greenhouse vegetable production bases of Beijing, China and an associated risk assessment. *Sci Total Environ*. 2015;521–522:101–107.
- [65] Pu Q, Zhao LX, Li YT, Su JQ. Manure fertilization increase antibiotic resistance in soils from typical greenhouse vegetable production bases, China. *J Hazard Mater*. 2020;391:122267.
- [66] Schwaiger K, Helmke K, Hölzel CS, Bauer J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *Int J Food Microbiol*. 2011;148(3):191–196.

- [67] Van Hoek AHAM, Veenman C, van Overbeek WM, Lynch G, de Roda Husman AM, Blaak H. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *Int J Food Microbiol*. 2015;204:1–8.
- [68] Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M et al. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011;365(19):1771–1780.
- [69] Blaak H, van Hoek AHAM, Veenman C, Docters van Leeuwen AE, Lynch G, van Overbeek WM, et al. Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. *Int J Food Microbiol*. 2014;168–169:8–16.
- [70] Lee DS, Lee SJ, Choe HS, Giacobbe DR. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *Biomed Res Int*. 2018;7656752; 14pp
- [71] Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal Colonization with Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 2016;63(3):310–8.
- [72] Alividza V, Mariano V, Ahmad R, Charani E, Rawson TM, Holmes AH, et al. Investigating the impact of poverty on colonization and infection with drug-resistant organisms in humans: a systematic review. *Infect Dis Poverty*. 2018;7(1):76
- [73] Halder AK, Tronchet C, Akhter S, Bhuiya A, Johnston R, Luby SP. Observed hand cleanliness and other measures of handwashing behavior in rural Bangladesh. *BMC Public Health*. 2010;10:545
- [74] Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(4):744–758.

- [75] Talukdar PK, Rahman M, Rahman M, Nabi A, Islam Z, Hoque MM, et al. Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh. *PLoS One*. 2013;8(4):e61090.
- [76] Adesoji AT, Ogunjobi AA. Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamases Resistance Genes among Bacteria Isolated from Selected Drinking Water Distribution Channels in Southwestern Nigeria. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:1–9.
- [77] Tängdén T, Cars O, Melhus Å, Löwdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: A prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(9):3564–3568.
- [78] De Angelis G. Malattie acute diarroiche e tossinfezioni alimentari. In: Carosi G, Cauda R, Castelli F, Taliani G, Viale P. Core curriculum malattie infettive. 2th ed. Milano: McGraw-Hill Education; 2016:65-75.
- [79] Woerther PL, Andremont A, Kantele A. Travel-acquired ESBL-producing Enterobacteriaceae: impact of colonization at individual and community level. *J Travel Med*. 2017;24(1):S29–S34.
- [80] Kantele A, Lääveri T, Mero S, Vilkinen K, Pakkanen SH, Ollgren J, et al. Antimicrobials Increase Travelers' Risk of Colonization by Extended-Spectrum Betalactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis*. 2015;60(6):837–46.
- [81] Van Der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-Van Der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)*. 1971;69:405–411.
- [82] Paltansing S, Vlot JA, Kraakman MEM, Mesman R, Bruijning ML, Bernards AT, et al. Extended-Spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among Travelers from the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(8):1206–1213.

- [83] Lübbert C, Straube L, Stein C, Makarewicz O, Schubert S, Mössner J, et al. Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany. *Int J Med Microbiol.* 2015;305(1):148–156.
- [84] Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, et al. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae after Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis.* 2015;61(4):593–600.
- [85] Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol.* 2011;2:1–13.
- [86] Blaak H, De Kruijf P, Hamidjaja RA, Van Hoek AHAM, De Roda Husman AM, Schets FM. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet Microbiol.* 2014;171(3–4):448–459.
- [87] Corcoran E, Nellesmann C, Baker E, Bos R, Osborn D, Savelli H (eds). 2010. Sick water? The central role of wastewater management in sustainable development. A rapid response assessment. United Nations Environment Programme, UN-HABITAT, GRID- arendal, Norway. 88p
- [88] Harder-Lauridsen NM, Kuhn KG, Erichsen AC, Mølbak K, Ethelberg S. Gastrointestinal Illness among Triathletes Swimming in Non-Polluted versus Polluted Seawater Affected by Heavy Rainfall, Denmark, 2010-2011. *PLoS One.* 2013;8(11):e78371.
- [89] Ahmed W, Hamilton K, Toze S, Cook S, Page D. A review on microbial contaminants in stormwater runoff and outfalls: Potential health risks and mitigation strategies. *Science of the Total Environment.* 2019; 692:1304-1321.

- [90] Korzeniewska E, Harnisz M. Culture-Dependent and Culture-Independent Methods in Evaluation of Emission of Enterobacteriaceae from Sewage to the Air and Surface Water. *Water Air Soil Pollut.* 2012;223(7):4039–4046
- [91] Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;91:96–102.
- [92] Smyth C, O’Flaherty A, Walsh F, Thuy Do T. Antibiotic resistant and extended-spectrum- β -lactamase producing faecal coliforms in wastewater treatment plant effluent. *Environmental Pollution.* 2020; 262:114244
- [93] O’Flaherty E, Solimini A, Pantanella F, Cummins E. The potential human exposure to antibiotic resistant-*Escherichia coli* through recreational water. *Sci Total Environ.* 2019;650:786–795.
- [94] Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Gaze WH. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ Int.* 2015; 82:92-100.
- [95] Franz E, Veenman C, Van Hoek AHAM, de Roda Husman A, Blaak H. Pathogenic *Escherichia coli* producing Extended-Spectrum β -Lactamases isolated from surface water and wastewater. *Sci Rep.* 2015;5:14372.
- [96] Søråas A, Sundsfjord A, Sandven I, Brunborg C, Jenum PA. Risk Factors for Community-Acquired Urinary Tract Infections Caused by ESBL-Producing Enterobacteriaceae -A Case-Control Study in a Low Prevalence Country. *PLoS One.* 2013;8(7):e69581.
- [97] Russo GS, Eftim SE, Goldstone AE, Dufour AP, Nappier SP, Wade TJ. Evaluating health risks associated with exposure to ambient surface waters during recreational activities: A systematic review and meta-analysis. *Water Res.* 2020;176:115729

- [98] Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect*. 2007;55:254–259.
- [99] Bassetti M, Pecori D, Sibani M, Corcione S, De Rosa FG. Epidemiology and Treatment of MDR Enterobacteriaceae. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2015;7:291–316.
- [100] Limmathurotsakul D, Dunachie S, Fukuda K, Feasey NA, Okeke IN, Holmes AH, et al. Improving the estimation of the global burden of antimicrobial resistant infections. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(11):e392–e398.
- [101] The Review on Antimicrobial Resistance (Chaired by Jim O’Neill). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. 2016. 84p
- [102] Esteve-Palau E, Solande G, Sánchez F, Sorlí L, Montero M, Güerri R, et al. Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* requiring hospitalization: A matched cohort study. *J Infect*. 2015;71:667–674.
- [103] Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(12):1057–98.
- [104] Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(1):56–66.