



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

STUDIO DELLA DIFFUSIONE DI
ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTI AI
CARBAPENEMI NELLA FILIERA BOVINA
E SUINA DELLA REGIONE MARCHE

STUDY OF THE DIFFUSION OF THE
CARBAPENEM-RESISTANT
ENTEROBACTERIACEAE ALONG THE
BOVINE AND SWINE SUPPLY CHAIN OF
THE MARCHE REGION

TESI SPERIMENTALE

Studente:
CHIARA DE ANGELIS

Relatore:
DOTT.SSA CRISTIANA GAROFALO

Correlatori:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIĆ
PROF.SSA CARLA VIGNAROLI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Al mio unico amore
perché è sempre stato al mio fianco
e mi dà la forza di fare qualunque cosa.
Alla mia famiglia
perché mi ha sempre sostenuta.
A me stessa
perché ce l'ho fatta.

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	2
ELENCO DELLE FIGURE	3
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	4
1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	5
1.1 Gli antibiotici	5
1.2 La resistenza agli antibiotici.....	6
1.3 Gli antibiotici carbapenemi ed i meccanismi di resistenza ai carbapenemi	9
1.4 I serbatoi di resistenza ai carbapenemi	12
1.5 Scopo della tesi	17
2. MATERIALI E METODI.....	19
2.1 Il campionamento.....	19
2.2 I terreni di coltura.....	22
2.3 Le conte vitali e la selezione di <i>Enterobacteriaceae</i> antibiotico-resistenti	24
2.4 Il test di Hodge e la determinazione della concentrazione minima inibente	27
2.5 L'estrazione di DNA microbico totale dagli omogenati dei campioni.....	32
2.6 La quantificazione del DNA estratto mediante spettrofotometro	32
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	33
3.1 Le conte vitali in piastra	33
3.2 Gli isolati antibiotico-resistenti	36
3.3 La quantificazione del DNA microbico.....	39
CONCLUSIONI	42
RINGRAZIAMENTI	44
BIBLIOGRAFIA.....	45

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1 - Elenco dei campioni ottenuti da un'azienda zootecnica biologica, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona	20
Tabella 2 - Elenco dei campioni ottenuti da due aziende zootecniche convenzionali, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona	20
Tabella 3 - Elenco dei campioni ottenuti da aziende suinicole convenzionali, progetto finanziato dalla Regione Marche	21
Tabella 4 - Composizione terreno MacConkey Agar	23
Tabella 5 - Composizione terreno LB	23
Tabella 6 - Composizione terreno MHII Broth	24
Tabella 7 - Composizione terreno MH Agar	24
Tabella 8 - Risultati delle conte vitali in piastra dei campioni ottenuti da un'azienda zootecnica biologica, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona.....	33
Tabella 9 - Risultati delle conte vitali in piastra dei campioni ottenuti da due aziende zootecniche convenzionali, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona	33
Tabella 10 - Risultati delle conte vitali in piastra di campioni ottenuti da aziende suinicole convenzionali, progetto finanziato dalla Regione Marche.....	34
Tabella 11 - Risultati della quantificazione di DNA microbico ottenuti attraverso lettura allo spettrofotometro di DNA estratto da campioni di un'azienda zootecnica biologica, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona	39
Tabella 12 - Risultati della quantificazione di DNA microbico ottenuti attraverso lettura allo spettrofotometro di DNA estratto da campioni di due aziende zootecniche convenzionali, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona	39
Tabella 13 - Risultati della quantificazione di DNA microbico ottenuti attraverso lettura allo spettrofotometro di DNA estratto da campioni di aziende suinicole convenzionali, progetto finanziato dalla Regione Marche.....	40

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1 - Aquisizione di resistenza causata dalla pressione selettiva nei confronti dei batteri	7
Figura 2 - Meccanismi di trasferimento genico	8
Figura 3 - Struttura chimica base dei carbapenemi.....	10
Figura 4 - Dinamica di diffusione della resistenza agli antibiotici tra diversi serbatoi	12
Figura 5 - Distribuzione globale di <i>Enterobacteriaceae</i> resistenti ai carbapenemi o di <i>Enterobacteriaceae</i> produttrici di carbapenemasi negli allevamenti ed in frutti di mare.....	14
Figura 6 - Protocollo di analisi microbiologiche e molecolari dei campioni di feci, carne, salame, formaggio, mangime, fegato, rene.....	25
Figura 7 - Procedura di conta vitale mediante utilizzo di diluizioni seriali del campione e semina per spatolamento	26
Figura 8 - Test di Hodge modificato	29
Figura 9 - Microtiter usata per la determinazione della MIC.....	30
Figura 10 - Piastra con test di Hodge dopo l'incubazione in cui è stata riscontrata la resistenza del ceppo isolato da FES16(5) indicato come "T" (in alto).....	36

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ABS	Assorbanza
AR	Antibiotico-resistenza
ATCCR®	Marchio registrato della American Type Culture Collection
<i>BLA</i>	β -lattamasi
D3A	Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (UNIVPM)
DISVA	Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (UNIVPM)
DO	Densità ottica
EPC	<i>Enterobacteriaceae</i> produttrici di carbapenemasi
GES	Guiana extended spectrum
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MHT	Modified Hodge Test
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
OXA	Carbapenem-hydrolysing oxacillinase
UFC	Unità Formanti Colonia
VIM	Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

1.1 Gli antibiotici

Gli antibiotici (antibatterici) sono sostanze naturali o di sintesi con azione batteriostatica o battericida. Possono essere prodotti da batteri, soprattutto quelli appartenenti al genere *Streptomyces*, o da funghi come *Aspergillus* o *Penicillium*. La parola “antibiotico” deriva dal greco *anti-biōsis* cioè “contro la vita”, infatti è una sostanza prodotta da un microrganismo capace di ucciderne altri o di inibirne la crescita (Madigan et al., 2014).

Nel 1929 Alexander Fleming, medico scozzese, conduceva sperimentazioni sui batteri e vide che una muffa aveva contaminato una piastra Petri, attorno a quella muffa si era formato un alone nel quale i batteri non erano cresciuti: la muffa ne inibiva la crescita. Questa muffa era *Penicillium chrysogenum* Thom, produttrice di penicillina, un antibiotico beta-lattamico che viene isolato dai prodotti del metabolismo del fungo. Dal 1941 questo antibiotico iniziò ad essere usato in medicina per la cura delle infezioni batteriche. Nei successivi anni iniziò la sua produzione a livello industriale per la cura delle infezioni durante la Seconda Guerra Mondiale; questo permise di ridurre al minimo i decessi per malattie come tifo, colera, tubercolosi, meningiti ma anche polmoniti e scarlattina; successivamente gli antibiotici sono stati introdotti anche in ambito veterinario e zootecnico (Madigan et al., 2014).

Ogni antibiotico può agire diversamente sulla cellula batterica, impedendone la riproduzione e/o la crescita mediante:

- inibizione sintesi e replicazione degli acidi nucleici;
- inibizione della sintesi proteica;
- inibizione della sintesi della parete cellulare;
- alterazione della membrana cellulare;
- interferenza con il metabolismo energetico.

Negli anni sono state introdotte sempre nuove molecole e di seguito sono riportate le principali classi di antibiotici per uso clinico:

- beta-lattamici (penicilline e cefalosporine);
- amminoglicosidi;

- macrolidi;
- tetracicline;
- fluorochinoloni;
- sulfamidici.

1.2 La resistenza agli antibiotici

La resistenza agli antimicrobici è la capacità di un microrganismo di resistere agli effetti di un antibiotico al quale è normalmente suscettibile. La resistenza agli antibiotici da parte di un ceppo batterico può dipendere da:

- mancanza del bersaglio su cui agisce quel determinato antibiotico (ad esempio i micoplasmi non hanno la parete cellulare per cui gli antibiotici che inibiscono la sintesi della parete -come la penicillina- non hanno effetto su questi batteri);
- impermeabilità della parete batterica alla molecola di antibiotico;
- capacità di inattivare la molecola dell'antibiotico attraverso produzione di enzimi specifici;
- modificazione del bersaglio dell'antibiotico;
- modificazione di una via biochimica (ad esempio un batterio resiste all'azione dei sulfamidici, antibiotici che inibiscono la sintesi di acido folico, producendo enzimi con una struttura modificata in grado di catalizzare le reazioni della via biosintetica nonostante la presenza dell'antibiotico; oppure assumendo l'acido folico direttamente dall'ambiente, annullando la necessità della via metabolica inibita dal farmaco);
- un processo di "efflusso" dell'antibiotico che permette al batterio di pompare all'esterno le molecole dell'antibiotico che entrano all'interno della cellula.

La resistenza di alcuni microrganismi agli antibiotici è una forma di adattamento che può avvenire in seguito a modificazione spontanea del genoma attraverso mutazioni, oppure attraverso l'acquisizione di geni che conferiscono resistenza all'antibiotico. Un batterio può acquisire e sviluppare resistenza ad un antibiotico grazie alla presenza di geni di antibiotico-resistenza (AR) che gli permettono di sopravvivere ai dosaggi di antibiotico che si raggiungono normalmente durante una terapia farmacologica. Un uso eccessivo od inappropriato di antibiotici ha portato nel tempo all'aumento di ceppi resistenti ai trattamenti antimicrobici. Questo è dovuto alla pressione selettiva a cui vengono sottoposti i batteri se vengono usate dosi sbagliate (sub-letali) o eccessive di antibiotico o se il trattamento viene sospeso prima del dovuto (*Figura 1*). Per questi motivi stiamo assistendo ad una sempre

maggior perdita di efficacia delle terapie e, di conseguenza, all'aumento di rischio per la salute umana (Wang et al., 2012).

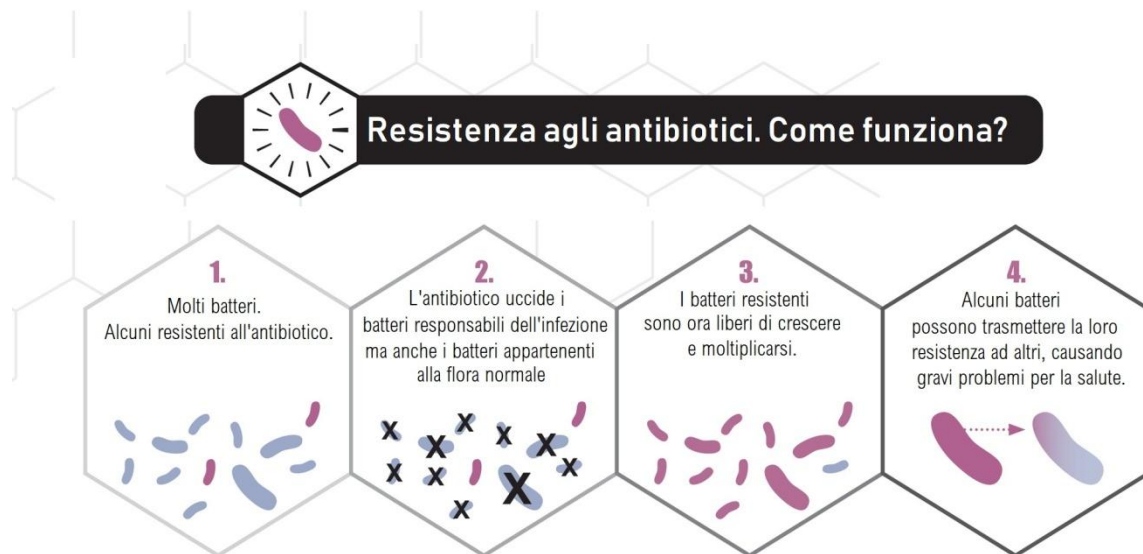


Figura 1 - Aquisizione di resistenza causata dalla pressione selettiva nei confronti dei batteri

(Melissa Brower, Center of Disease Control and Detection)

Questi geni di resistenza sono localizzati spesso su elementi genetici mobili quali plasmidi, integroni e trasposoni. A partire da questi batteri resistenti, i geni possono essere trasferiti, attraverso diversi meccanismi di trasferimento genico verticale e orizzontale, ad altri batteri, normalmente suscettibili all'antibiotico, che acquisiranno AR (Madigan et al., 2014).

Il trasferimento genico verticale si osserva ogni volta che una cellula si duplica per scissione binaria: il materiale genetico, dopo duplicazione, viene trasmesso dalla cellula madre alle cellule figlie, garantendo alla progenie una copia del patrimonio genetico originario, di generazione in generazione. In questo caso, se la cellula madre possiede i geni per la resistenza, li trasmetterà a tutte le cellule figlie.

Il trasferimento genico orizzontale può avvenire attraverso tre meccanismi (*Figura 2*):

- trasduzione;
- trasformazione;
- coniugazione.

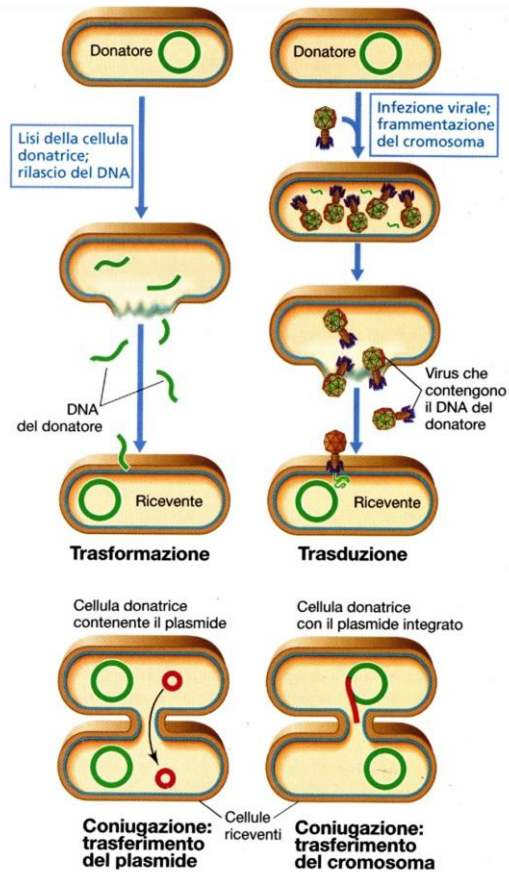


Figura 2 - Meccanismi di trasferimento genico

(Madigan et al., 2014; Brock, Biologia dei microrganismi, Ed. Pearson, 2014)

La *trasduzione* avviene quando nella cellula batterica viene introdotto nuovo materiale genetico attraverso l'infezione di un batteriofago. Nel momento in cui un fago infetta una cellula batterica, questo può andare in contro a due modalità di replicazione che vengono dette: ciclo litico e ciclo lisogeno. Nel primo caso, dopo il rilascio del genoma virale all'interno della cellula batterica, si osserva replicazione e trascrizione del genoma virale, seguita da una sintesi dei singoli componenti virali e dall'assemblaggio dei virioni che porteranno alla lisi della cellula ospite e al rilascio delle nuove particelle fagiche nell'ambiente. Nel ciclo lisogeno il materiale genetico virale viene mantenuto silente nella cellula ospite, spesso integrato nel cromosoma batterico e, solo in condizioni particolari, si innescherà il ciclo litico. Quando durante il ciclo litico avviene l'assemblaggio della progenie virale, l'errato incapsidamento di frammenti di DNA batterico può portare a fenomeni di trasduzione generalizzata o specializzata, con il conseguente trasferimento di materiale genetico di origine batterica da un ospite all'altro, mediato dall'infezione fagica.

La *trasformazione* è la capacità di alcune cellule batteriche, che si trovano in uno stato fisiologico particolare detto “competenza”, di internalizzare frammenti di DNA esogeno attraverso proteine chiamate “fattori di competenza” (questa capacità è ereditata geneticamente). Se una cellula contenente i geni per la resistenza va incontro a lisi, il suo materiale genetico andrà disperso nell’ambiente. Trattandosi di un’unica molecola di DNA molto lunga, il cromosoma si rompe in piccoli frammenti ed una cellula competente potrà così internalizzare alcune porzioni di DNA. Per far sì che avvenga la trasformazione della cellula ricevente intervengono delle proteine che mediano la ricombinazione del nuovo frammento con il cromosoma, in questo modo la cellula ricevente risulterà “trasformata” e, se il DNA esogeno acquisito codifica per la resistenza ad un antibiotico, la cellula trasformata diventerà resistente all’antibiotico.

Per la *coniugazione* sono necessari il contatto tra due cellule batteriche e la presenza di un plasmide coniugativo nella cellula donatrice. Questo plasmide è una molecola di DNA extracromosomico che può essere trasferita attraverso la formazione di un apparato di coniugazione, codificato dal plasmide stesso. I plasmidi, in genere, non contengono informazioni di vitale importanza per la cellula, ma possono codificare funzioni che aumentano la capacità di sopravvivenza del batterio, (per esempio possono contenere geni per l’antibiotico-resistenza che favoriscono la sopravvivenza del batterio in ambiente selettivo). Nei batteri gram-negativi, tra i geni contenuti nel plasmide, essenziali per il trasferimento sono quelli che permettono la sintesi di un pilo sessuale: questo consente la connessione tra cellula donatrice e cellula ricevente ed il successivo trasferimento di un’elica del plasmide alla cellula ricevente. Successivamente avverrà la sintesi dell’elica complementare ed entrambe le cellule mostreranno una copia dello stesso plasmide. Se dunque si tratta di un plasmide che porta geni di resistenza, la cellula ricevente acquisisce AR. È chiaro quindi come il fenomeno della coniugazione tra ceppi appartenenti alla stessa specie o a specie diverse assuma importanza nella diffusione globale dell’antibiotico-resistenza.

1.3 Gli antibiotici carbapenemi ed i meccanismi di resistenza ai carbapenemi

I carbapenemi sono antibiotici appartenenti alla classe dei beta-lattamici. A questa classe appartengono molecole che inibiscono la sintesi della parete batterica, in particolar modo si inseriscono nel sito attivo delle *transpeptidasi* inibendone l’azione. Le *transpeptidasi* sono enzimi che permettono la formazione di legami crociati tra le catene di peptidoglicano della parete batterica. Tali legami sono fondamentali per l’integrità e la funzionalità del

peptidoglicano, un polimero presente in grande quantità nella parete dei gram-positivi e in concentrazione del 10% in quella dei gram-negativi. Senza la formazione del peptidoglicano la sintesi della parete cellulare viene inibita con conseguente perdita di protezione dalla lisi osmotica.

La molecola dei beta-lattamici presenta come nucleo principale un anello a 4 atomi chiamato lattame. Questa amide ciclica può trovarsi da sola, come nella molecola dei monobattami, oppure può legarsi ad altri anelli a 5 o 6 atomi contenenti o meno un eteroatomo (Madigan et al., 2014).

I carbapenemi usati oggi derivano tutti da una molecola, la tienamicina, naturalmente prodotta da *Streptomyces cattleya*. Da questa sono nati diversi carbapenemi tra cui:

- imipenem;
- meropenem;
- ertapenem;
- doripenem;
- panipenem;
- biapenem.

Hanno tutti in comune un anello β -lattamico, il lattame, legato ad un anello pirrolidinico a 5 atomi contenente un atomo di azoto (eteroatomo) e con un doppio legame che lega un gruppo carbossilico (formula chimica di base rappresentata in *Figura 3*).

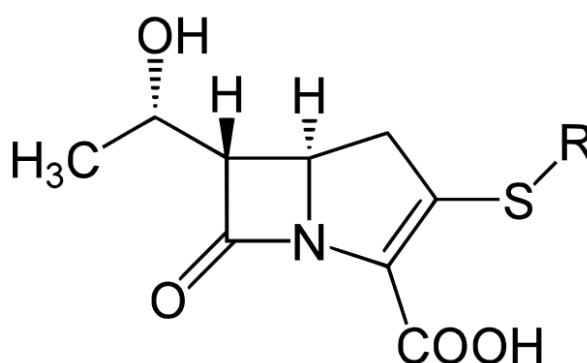


Figura 3 - Struttura chimica base dei carbapenemi

(Yikrazuul, 2009)

I carbapenemi sono antibiotici ad ampio spettro d'azione, attivi contro batteri gram-negativi, alcuni gram-positivi e batteri anaerobici. Sono usati per la cura di infezioni da batteri gram-negativi multi-resistenti, infatti i carbapenemi sono l'ultima frontiera per la cura di alcune patologie batteriche contro le quali altri antibiotici non sono efficaci (Zhanel et al.,

2007). Per questo, in ambito ospedaliero, sono considerati tra gli antimicrobici più importanti (FAO/WHO/OIE, 2008).

La resistenza ai carbapenemi, riscontrata soprattutto nelle *Enterobacteriaceae*, rappresenta una grave problematica emergente in sanità pubblica, dato che le opzioni terapeutiche alternative a questi farmaci sono limitate e richiedono il ricorso a combinazioni di antibiotici che spesso comprendono molecole non usate da molti anni e relativamente tossiche (Poulakou et al., 2014).

La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende più di 100 specie di batteri gram-negativi il cui habitat naturale è costituito dall'intestino dell'uomo e di altri animali vertebrati. Sono microrganismi ubiquitari molto importanti dal punto di vista medico, possiamo anche trovarli nel suolo, nell'acqua e nella vegetazione.

Il meccanismo di resistenza ai carbapenemi più comune è quello della produzione di particolari enzimi, chiamati carbapenemasi, in grado di idrolizzare la molecola antibiotica. In tal modo le *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (EPC) manifestano una resistenza estesa anche agli altri antibiotici beta-lattamici (Tzouvelekis et al., 2012; Doi and Paterson, 2015; Fischer et al., 2017).

Nei pazienti infetti da *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi quindi, soprattutto nel caso di infezioni invasive quali le batteriemie, il tasso di mortalità è elevato, sia per il ritardo nella somministrazione di una terapia efficace, sia per la limitata disponibilità terapeutica rimanente che obbliga all'uso di antibiotici meno efficaci e/o maggiormente tossici (Nordmann et al., 2012).

Benché la produzione di carbapenemasi rappresenti il meccanismo più importante di resistenza ai carbapenemi riscontrato nelle *Enterobacteriaceae*, questo non è l'unico. Infatti, la resistenza può essere causata anche da una ridotta permeabilità della membrana batterica (per perdita di porine) che non permette all'antibiotico di raggiungere il bersaglio, da un aumentato efflusso del farmaco, o da iperproduzione di altri tipi di β -lattamasi. Questi ultimi meccanismi, in genere, conferiscono una diminuita sensibilità o una bassa resistenza solo ad alcuni carbapenemi (Sabbatucci et al., 2018).

Le carbapenemasi prodotte dalle *Enterobacteriaceae* sono diverse, le più comuni ed importanti dal punto di vista epidemiologico sono:

- le Serina β -lattamasi di classe A che comprendono le KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e le GES (Guiana estende spectrum);
- le Metallo- β -lattamasi di classe B che includono le VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) e le NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase);

- le Serina β -lattamasi di classe D che comprendono le carbapenemasi OXA (Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase).

Le carbapenemasi sono codificate da geni localizzati su elementi genetici mobili, per questo sono facilmente trasferibili ad altri batteri attraverso trasferimento genico orizzontale e questo aumenta le loro possibilità di diffondersi (Fischer et al., 2017; Nordmann et al., 2012).

1.4 I serbatoi di resistenza ai carbapenemi

Il settore agricolo rappresenta un serbatoio importante nella diffusione di residui di antibiotici nell'ambiente a causa del loro uso come biocidi o additivi per le colture e gli allevamenti. Di conseguenza tutti gli ambienti adiacenti come acqua, suolo e piante, sono da ritenersi importanti per lo studio delle dinamiche di AR (Heuer et al., 2011; Baquero et al., 2008). Da questi ambienti è poi naturale il passaggio di geni e batteri di resistenza agli antibiotici agli alimenti di origine animale e vegetale. La dieta umana rappresenta così una delle vie principali di diffusione di AR all'uomo e poi dall'uomo, per via diretta od indiretta, la contaminazione ritorna all'ambiente o si diffonde nella comunità (Comunian et al., 2010; Li et al., 2011; Wang, 2009). I batteri resistenti agli antibiotici possono anche insorgere e svilupparsi nell'intestino umano in seguito all'uso di antibiotici per la cura di infezioni umane. Gli ospedali rappresentano altri serbatoi di diffusione di antibiotico-resistenze trasmissibili. Tutte queste dinamiche di diffusione dell'AR sono rappresentate in *Figura 4*.

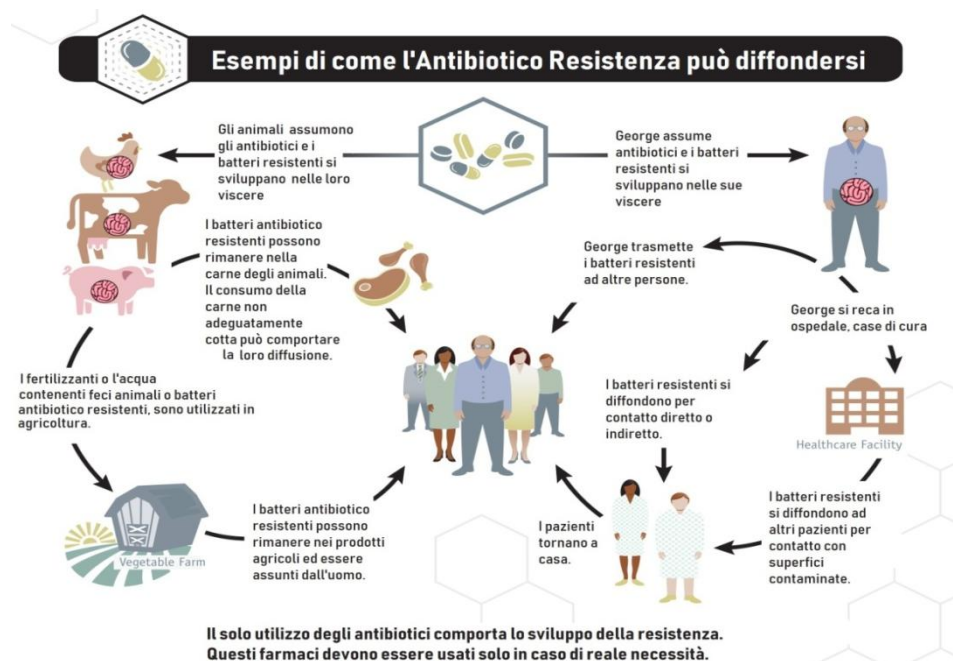


Figura 4 - Dinamica di diffusione della resistenza agli antibiotici tra diversi serbatoi

(Melissa Brower, Centers for Disease Control and Prevention)

Negli ultimi anni la resistenza agli antibiotici carbapenemi si sta diffondendo sempre di più e questo fenomeno rappresenta una vera e propria emergenza sanitaria in quanto essa viene riscontrata soprattutto nelle *Enterobacteriaceae* ed, in particolare, nelle specie di maggiore importanza nelle infezioni ospedaliere, quali *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli*. In secondo luogo, tale resistenza si evidenzia anche in batteri non fermentanti come *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. ed in alcuni batteri non patogeni quali *Stenotrophomonas* spp. e *Myroides* spp. (Miriagou et al., 2003; Grundmann et al., 2010; Nordmann et al., 2011, 2012; Cantón et al., 2012; Tzouveleakis et al., 2012; Guerra et al., 2014; Doi and Paterson, 2015; Morrison and Rubin, 2015).

L'ultimo decennio è stato caratterizzato da una rapida e globale diffusione di infezioni causate da *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (EPC) negli ospedali e questo fenomeno desta forti preoccupazioni in quanto, molto spesso, questi focolai di infezione sono associati ad alti tassi di mortalità (Zhang et al., 2017). L'attuale opinione scientifica è che le carbapenemasi acquisite siano una delle principali pressanti minacce alla salute pubblica legate alla AR (Tzouveleakis et al., 2012; EFSA BIOHAZ Panel, 2013; Woodford et al., 2014; Doi and Paterson, 2015).

Nel corso degli ultimi anni sono stati svolti diversi studi scientifici, volti a individuare le fonti di diffusione dei batteri resistenti ai carbapenemi ed i relativi geni.

È noto che la presenza di geni e batteri che conferiscono resistenza agli antibiotici in animali da allevamento rappresenta una via di diffusione di AR alla popolazione umana attraverso la catena alimentare (Caniça et al., 2015). In tutto il mondo è vietato l'uso dei carbapenemi per le produzioni zootecniche (OIE, 2015), di conseguenza si presume che resistenze ai carbapenemi in animali allevati per l'alimentazione umana siano assenti (Webb et al., 2016). Nonostante -o forse a causa- della mancanza di una pressione di selezione diretta, si sa poco circa la prevalenza di EPC negli allevamenti e negli ambienti a loro associati. Inoltre, proprio perché l'uso dei carbapenemi è proibito, in Europa non esistono limiti legalmente "sicuri" per queste molecole nelle carni, infatti non è stato definito alcun limite massimo di residui di tali antibiotici. Qualsiasi animale da allevamento zootecnico trattato con carbapenemi, quindi, non potrebbe entrare nella catena alimentare (Woodford et al., 2014).

Tuttavia, recentemente, la resistenza ai carbapenemi è stata rilevata in diversi serbatoi ambientali tra cui allevamenti bovini in Francia, Germania, Svizzera, Stati Uniti e Cina (Guerra et al., 2014; Webb et al., 2016; Zurfluh et al., 2016; Fischer et al., 2017; Köck et al., 2018), animali da compagnia e fauna selvatica (Guerra et al., 2014; Woodford et al., 2014;

Köck et al., 2018), ambienti acquatici (Zurfluh et al., 2013; Guerra et al., 2014; Woodford et al., 2014; Fernando et al., 2016; Köck et al., 2018), carne di pollo venduta al dettaglio in Egitto (Abdallah et al., 2015), verdure e frutti di mare provenienti da Asia, India e Brasile (Guerra et al., 2014; Morrison and Rubin, 2015; Zurfluh et al., 2015, 2016; Köck et al., 2018). In particolare, nel 2015 e nel 2016 Zurfluh e collaboratori hanno rilevato la presenza di *Klebsiella variicola* produttrice di $bla_{OXA-181}$ in ortaggi freschi importati in Svizzera dall'Asia. I risultati di questo studio suggeriscono che anche la produzione ed il commercio internazionale di ortaggi freschi costituiscono una possibile via per la diffusione di *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (Zurfluh et al., 2015, 2016). Anche l'uso di letame come ammendante, ad esempio, può essere una fonte di diffusione nel terreno di *Enterobacteriaceae* antibiotico-resistenti, questi batteri possono contaminare le verdure destinate al consumo umano ed il mangime utilizzato negli allevamenti (Caniça et al., 2015).

Dalla review di Köck e collaboratori (2018), si ottiene una efficace fotografia relativa alla distribuzione di EPC in diversi allevamenti nel mondo. In dettaglio, vengono riportati studi che hanno individuato EPC in:

- allevamenti avicoli in Algeria, Bangladesh, Cina, Egitto, Germania, India, Libano, Spagna, Regno Unito e Stati Uniti;
- allevamenti di bovini in Algeria, Cina, Egitto, India ed Inghilterra;
- allevamenti di suini in Cina, Germania, India, Italia, Romania e Regno Unito.

La distribuzione di questi serbatoi di resistenza ai carbapenemi è descritta in *Figura 5*.

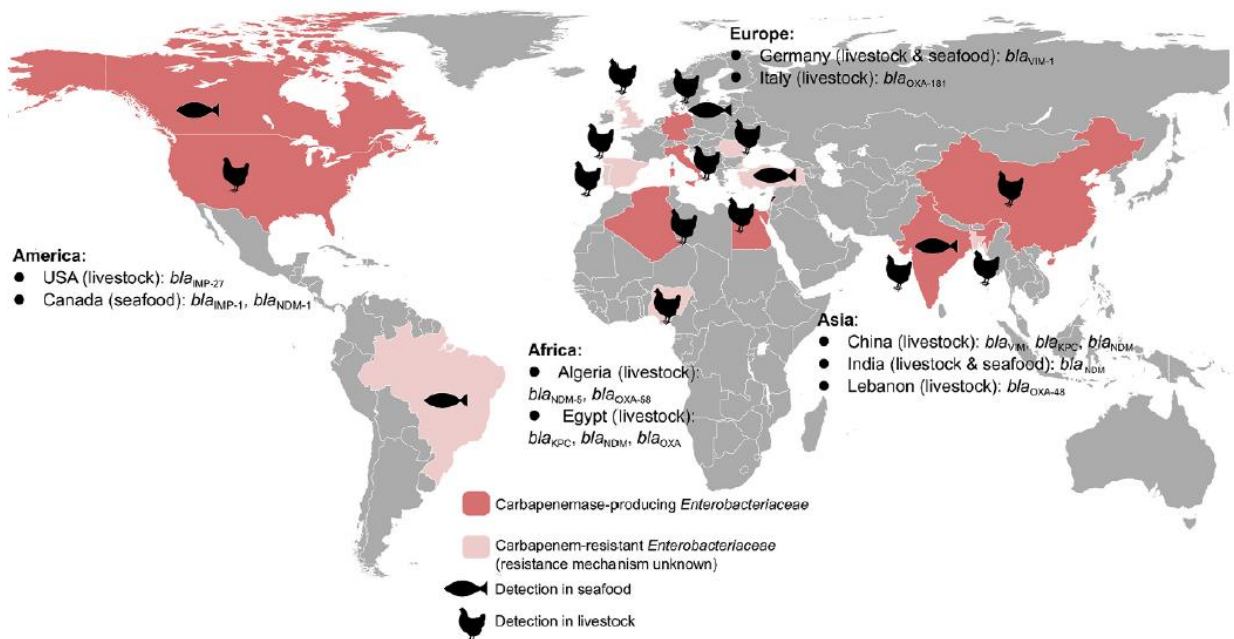


Figura 5 - Distribuzione globale di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi o di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi negli allevamenti ed in frutti di mare (Köck et al., 2018)

Infine, nel 2018, Milanović e collaboratori hanno pubblicato uno studio di ecologia microbica e ricerca di geni codificanti carbapenemasi in campioni di insetti edibili. L'uso di insetti per il consumo umano è una pratica frequente in tutto il mondo, principalmente in Asia, Africa, Sud America e Australia. In Europa, gli insetti edibili rappresentano un'innovativa fonte di proteine e non sono comunemente consumati, d'altro canto in alcuni paesi europei, in particolare nei Paesi Bassi e in Belgio, l'allevamento e la produzione industriale di insetti commestibili sta crescendo gradualmente. Sulla base di queste premesse, anche gli insetti edibili meritano grande attenzione in termini di sicurezza alimentare, compresa la valutazione dell'incidenza di geni AR tra cui geni codificanti carbapenemasi (Milanović et al., 2018). In particolare, nello studio, sono stati analizzati 30 campioni di insetti appartenenti alla specie *Locusta migratoria migratorioides* e 30 campioni di larve di *Tenebrio molitor* L. provenienti da Tailandia, Paesi Bassi e Belgio. Attraverso q-PCR sono stati ricercati i cinque principali geni codificanti carbapenemasi: *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}. Lo studio ha dimostrato la presenza del gene *bla*_{OXA-48} in un campione di larve di *T. molitor* (3%) e nel 57% dei campioni di locuste. Il gene *bla*_{NDM-1} era presente in 3 campioni (10%) di larve di *T. molitor* e nel 27% dei campioni di locuste, mentre *bla*_{VIM} è stato riscontrato nel 7% dei campioni di locuste. Per quanto riguarda lo studio di ecologia microbica, mediante la tecnica PCR-DGGE, sono stati riscontrati diversi generi batterici presenti, tra cui *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Weissella*.

Da tutto ciò, emerge che l'antibiotico-resistenza è una reale emergenza sanitaria e che geni e batteri che conferiscono resistenza agli antibiotici, tra cui anche i carbapenemi, vengono scambiati tra ecosistemi diversi (acqua, suolo, animali, piante, cibo, uomo...) strettamente collegati fra loro (Caniça et al., 2015). Inoltre, esiste la possibilità che alcune molecole di antibiotici causino nei microrganismi anche la resistenza ad altri antibiotici affini da un punto di vista strutturale.

Pertanto, è importante attuare programmi di monitoraggio della diffusione di resistenze (geni e batteri) ai carbapenemi in sistemi agricoli e negli allevamenti, al fine di controllare e limitare la diffusione di tali resistenze (Fisher et al., 2017; Webb et al., 2016).

Secondo il Report 2015 sui dati del programma di sorveglianza europea dell'antibiotico-resistenza EARSNet, coordinata dall'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), l'Italia è, insieme alla Grecia, un paese con percentuali ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi molto superiori alla media europea. Altri paesi con percentuali rilevanti sono Cipro e Romania, e benché ancora bassa, la percentuale di resistenza ai carbapenemi è in aumento in numerosi paesi, soprattutto quelli dell'area mediterranea e

dell'Est europeo. Nello studio EuSCAPE (*European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae*), finanziato dall'ECDC con lo scopo di migliorare la sorveglianza delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi in Europa, l'Italia è stata considerata un paese endemico per EPC già dal 2013 (Sabbatucci et al., 2017).

Per riuscire a contenere il più possibile il problema dell'antibiotico-resistenza e salvaguardare di conseguenza la salute umana, è necessario incrementare gli studi scientifici volti a chiarire quali sono i serbatoi e le dinamiche di diffusione delle antibiotico-resistenze trasmissibili.

1.5 Scopo della tesi

La presente Tesi di Laurea è stata svolta nell'ambito di due diversi progetti dal titolo: "Diffusione della resistenza agli antibiotici carbapenemici: ricerca dei serbatoi ambientali" (progetto di carattere nazionale e finanziato dalla Fondazione Cariverona) e "Reduction of the use of antibiotics in pig breeding: production and quality effects" (progetto finanziato dalla Regione Marche).

Il primo progetto prevede una collaborazione tra l'Università Politecnica delle Marche [Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A) e Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA)], l'Università degli Studi di Verona, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE). Lo scopo di questo progetto è quello di individuare i serbatoi non umani di EPC e studiarne le cause e le dinamiche di diffusione nelle province di Ancona e Verona. I risultati saranno utili per definire strategie da mettere in atto per limitare la diffusione di resistenze ai carbapenemi, al fine di salvaguardare la salute umana. La distribuzione di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (EPC) verrà valutata in diversi campioni di origine umana (campioni di feci e tamponi rettali di soggetti ospedalizzati) ed agroalimentare (molluschi bivalvi, mangimi, feci animali, carne e prodotti zootecnici trasformati). I campioni verranno analizzati con metodi coltura-dipendenti per enumerare ed isolare *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi. Questi isolati verranno poi identificati, tipizzati ed analizzati per individuare i principali geni di resistenza ai carbapenemi (*bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*). Inoltre, si procederà anche allo studio del DNA microbico estratto direttamente dai campioni in esame per verificare la presenza dei geni in esame mediante tecniche molecolari quali Real-Time PCR o Droplet-PCR.

Il secondo progetto ha lo scopo finale di ridurre l'uso degli antibiotici in aziende suinicole della Regione Marche fino all'ottenimento della certificazione "Antibiotic Free", a partire dall'eliminazione degli antibiotici negli ultimi 120 giorni prima della macellazione dei suini. Uno scopo intermedio è quello di valutare se la filiera suina della Regione Marche possa rappresentare un serbatoio di diffusione di resistenze ai carbapenemi. Le attività che vedono coinvolte l'Area di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A), prevedono che il giorno della macellazione vengano campionati mangimi, feci, organi (fegato e reni), carne suina e prodotti trasformati, al fine di isolare eventuali ceppi di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi. Verrà inoltre estratto il DNA microbico totale con l'obiettivo di ricercare geni che codificano le più comuni carbapenemasi attraverso Real-Time PCR o Droplet-PCR.

In dettaglio, le analisi svolte nella presente Tesi di Laurea hanno previsto la enumerazione di *Enterobacteriaceae* presenti in campioni di mangimi, feci, carne, salame, fegato e reni di suini e in campioni di mangimi, feci, carne e formaggio di bovini. Successivamente sono state isolate colonie sospette cresciute in presenza di ertapenem. Su questi isolati, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA), sono stati eseguiti ulteriori test per accertare la loro resistenza: il Test di Hodge ed il test per la determinazione della concentrazione minima inibente o MIC (Minimal Inhibitory Concentration). Infine, direttamente dalle matrici oggetto dello studio, è stato estratto il DNA microbico totale e, successivamente, è stato quantificato mediante spettrofotometro. Questo DNA verrà analizzato successivamente da altre unità coinvolte nei progetti sopra descritti, per la ricerca e la caratterizzazione dei geni di resistenza ai carbapenemi, mediante Real-Time PCR o Droplet-PCR e sequenziamento.

La presente Tesi di Laurea ha pertanto lo scopo di contribuire alla individuazione in ambito zootecnico, di eventuali serbatoi di resistenza ai carbapenemi.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Il campionamento

I campionamenti sono stati effettuati in diverse aziende della Regione Marche nel periodo compreso tra il 09-04-2019 ed il 23-07-2019.

Per il progetto “Diffusione della resistenza agli antibiotici carbapenemici: ricerca dei serbatoi ambientali” (finanziato dalla Fondazione Cariverona) sono state scelte diverse aziende situate nella provincia di Ancona: una di esse è un’azienda a conduzione biologica (campioni elencati *Tabella 1*) ed altre due sono convenzionali (campioni elencati in *Tabella 2*).

Per quanto riguarda i campioni relativi al progetto “Reduction of the use of antibiotics in pig breeding: production and quality effects” (finanziato dalla Regione Marche) sono stati reperiti da due diverse aziende suinicole site rispettivamente a Mercatello sul Metauro e a Fabriano; questi campioni sono elencati in *Tabella 3*.

Tabella 1 - Elenco dei campioni ottenuti da un'azienda zootecnica biologica, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DATA
3	Feci bovine	FB13	10-04-19
4	Feci suine	FS13	10-04-19
5	Carne bovina	CB13	10-04-19
6	Carne suina	CS13	10-04-19
7	Salame fegato	SAL13	10-04-19
8	Formaggio	FOR13	10-04-19
34	Feci bovine	FB17	28-05-19
35	Feci suine	FS17	28-05-19
36	Mangime bovino (fieno di medica)	MB17	28-05-19
52	Carne bovina	CB19	23-07-19
53	Salame	SAL19	23-07-19
54	Formaggio	FOR19	23-07-19

Tabella 2 - Elenco dei campioni ottenuti da due aziende zootecniche convenzionali, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DATA
1	Carne bovina	CB12	09-04-19
2	Feci bovine	FB12	09-04-19
9	Carne suina	CS14(1)	15-04-19
10	Carne suina	CS14(2)	15-04-19
11	Feci suine	FS14(1)	15-04-19
12	Feci suine	FS14(2)	15-04-19

Tabella 3 - Elenco dei campioni ottenuti da aziende suinicole convenzionali, progetto finanziato dalla Regione Marche

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DATA
13	Feci suine	FS15(1)	06-05-19
14	Feci suine	FS15(2)	06-05-19
15	Feci suine	FS15(3)	06-05-19
16	Feci suine	FS15(4)	06-05-19
17	Feci suine	FS15(5)	06-05-19
18	Mangime suino (sfarinato di cereali)	MS15	06-05-19
19	Carne suina	CS16(1)	08-05-19
20	Carne suina	CS16(2)	08-05-19
21	Carne suina	CS16(3)	08-05-19
22	Carne suina	CS16(4)	08-05-19
23	Carne suina	CS16(5)	08-05-19
24	Rene suino	RES16(1)	08-05-19
25	Rene suino	RES16(2)	08-05-19
26	Rene suino	RES16(3)	08-05-19
27	Rene suino	RES16(4)	08-05-19
28	Rene suino	RES16(5)	08-05-19
29	Fegato suino	FES16(1)	08-05-19
30	Fegato suino	FES16(2)	08-05-19
31	Fegato suino	FES16(3)	08-05-19
32	Fegato suino	FES16(4)	08-05-19
33	Fegato suino	FES16(5)	08-05-19
37	Carne suina	CS18(1)	18-06-19
38	Carne suina	CS18(2)	18-06-19
39	Carne suina	CS18(3)	18-06-19
40	Carne suina	CS18(4)	18-06-19
41	Carne suina	CS18(5)	18-06-19
42	Rene suino	RES18(1)	18-06-19
43	Rene suino	RES18(2)	18-06-19
44	Rene suino	RES18(3)	18-06-19
45	Rene suino	RES18(4)	18-06-19
46	Rene suino	RES18(5)	18-06-19
47	Fegato suino	FES18(1)	18-06-19
48	Fegato suino	FES18(2)	18-06-19
49	Fegato suino	FES18(3)	18-06-19
50	Fegato suino	FES18(4)	18-06-19
51	Fegato suino	FES18(5)	18-06-19

Tutti i prelievi di feci sono stati ottenuti da un mix di 3-5 campioni di feci, prelevate all'interno del box in cui erano allevati i soggetti che sono stati macellati, successivamente è stata prelevata la quantità necessaria per riempire un contenitore per feci sterile (60 mL).

Un campione di carne (100 g), un fegato ed un rene interi sono stati prelevati direttamente al mattatoio da 5 soggetti macellati in due differenti giorni di macellazione.

Il fieno (30 g) e gli sfarinati di cereali (100 g), utilizzati come mangimi, sono stati prelevati direttamente dai fienili e dai silos.

I campioni di formaggio (100 g) e salame (100 g) sono stati prelevati al banco vendita dell'azienda.

Il campionamento è stato sempre effettuato in condizioni di sterilità con guanti sterili monouso, forbici e pinze sterili, sacchetti per Stomacher e contenitori sterili per feci. Arrivate in laboratorio in condizioni refrigerate, le matrici sono state conservate in cella fredda (4°C) e processate entro 24 ore.

2.2 I terreni di coltura

Per l'isolamento di *Enterobacteriaceae* sono stati usati due diversi terreni di coltura: il MacConkey Agar per le conte vitali in piastra, ed il terreno Luria Bertani Broth per l'arricchimento dei microrganismi dagli omogenati.

Il MacConkey Agar è un terreno di coltura agarizzato, selettivo e differenziale, infatti permette la differenziazione dei batteri coliformi dai batteri non fermentanti il lattosio, inibendo la crescita della maggior parte dei batteri gram-positivi. Il terreno liofilizzato (la cui composizione è indicata in *Tabella 4*) è stato diluito in acqua secondo le indicazioni riportate sulla confezione (Oxoid Limited, United Kingdom) e, successivamente, sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti. Sono state poi realizzate delle piastre Petri per la conta vitale in piastra, e piastre contenenti ertapenem (0,12 µg/mL) per l'isolamento di *Enterobacteriaceae* resistenti ad ertapenem.

Tabella 4 - Composizione terreno MacConkey Agar

(Oxoid Limited, United Kingdom)

Peptone	20,0 g/L
Lattosio	10,0 g/L
Sali biliari n° 3	1,5 g/L
Cloruro di Sodio	5,0 g/L
Rosso neutro	0,03 g/L
Cristalvioletto	0,001 g/L
Agar	15,0 g/L
pH 7,1 ± 0,2 a 25°C	

Il LB Broth è un terreno liquido ricco, adatto alla crescita di diverse specie batteriche. È stato usato con la finalità di aumentare il numero di batteri presenti negli omogenati dei campioni, e con la successiva semina in agar MacConkey contenente ertapenem (0.12 µg/mL), di aumentare le probabilità di selezionare *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi. Il terreno è stato preparato in laboratorio con gli ingredienti presenti nella *Tabella 5*, sterilizzato in tubi da 10 mL e, subito prima dell'inoculo, vi è stato aggiunto ertapenem ad una concentrazione finale di 0.12 µg/mL.

Tabella 5 - Composizione terreno LB

Triptone	10,0 g/L
Estratto di lievito	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
pH 7 ± 0,2 a 25°C	

Il test di Hodge e la determinazione della MIC hanno previsto l'uso del brodo Mueller Hinton II (MHII Broth, Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis) e del Mueller Hinton Agar (MH Agar, Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis): due terreni usati di routine per i test di sensibilità antimicrobica. Il terreno MHII Broth è stato addizionato di sali in modo da avere una concentrazione finale di ioni Ca²⁺ pari a 20-25 mg/L e di ioni Mg²⁺ pari a 10-12,5 mg/L. Questi substrati hanno una composizione standard consultabile in *Tabella 6* e *Tabella 7*.

Tabella 6 - Composizione terreno MHII Broth

(Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis)

Idrolizzato acido di caseina	17,5 g/L
Estratto di carne	3,0 g/L
Amido	1,5 g/L
pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C	

Tabella 7 - Composizione terreno MH Agar

(Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis)

Idrolizzato acido di caseina	17,5 g/L
Infuso di cuore bovino	2,0 g/L
Amido solubile	1,5 g/L
Agar	17,0 g/L
pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C	

Per le varie diluizioni nel corso delle conte vitali è stata usata acqua peptonata: acqua deionizzata con aggiunta di peptone ad una concentrazione finale di 10,0 g/L. Come tutti i terreni, anche l'acqua peptonata (posta in beute da 90 mL e in provette da 9 mL) è stata sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti.

2.3 Le conte vitali e la selezione di *Enterobacteriaceae* antibiotico-resistenti

In laboratorio sono state eseguite le conte vitali e l'isolamento di *Enterobacteriaceae* seguendo un protocollo descritto di seguito nelle sue varie fasi, anche schematizzate, illustrate in *Figura 6*.

- Omogenizzare il campione (10g di feci, carne, salame, formaggio, mangime, fegato, rene) in 100 mL di acqua peptonata tamponata
- Allestire diluizioni dell'omogenato e seminarle su terreno selettivo per la conta delle *Enterobacteriaceae* (MacConkey)
- Incubare a 37° C *overnight*
- Contemporaneamente, centrifugare aliquote da 1,5 mL di omogenato e congelare i pellet a -20° C per la successiva estrazione di DNA microbico
- Contemporaneamente, dall'omogenato diluire (1:100) in brodo Luria - Bertani (LB) + antibiotico ovvero prelevare 0,1 mL di omogenato e aggiungerli a 10 mL di brodo LB + 0,12 µg/mL ertapenem
- Incubare 37°C *overnight*
- dai campioni in cui si osserva intorbidimento:
 - svolgere estrazione del DNA microbico totale con kit (E.Z.N.A. Soil DNA Kit) dai pellet degli omogenati congelati
 - effettuare l'isolamento su MacConkey + 0,12 µg/mL ertapenem dall'arricchimento LB + 0,12 µg/mL ertapenem
- identificazione (sequenziamento del gene per il 16S rRNA) e caratterizzazione degli isolati (MIC, PCR per la ricerca dei geni, tipizzazione)

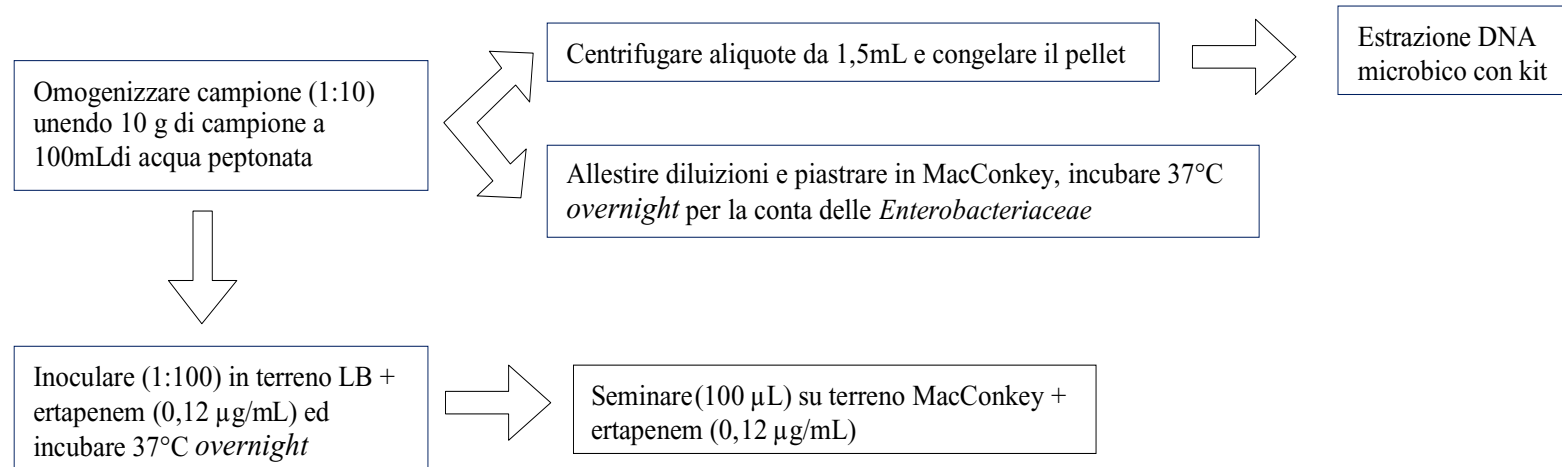


Figura 6 - Protocollo di analisi microbiologiche e molecolari dei campioni di feci, carne, salame, formaggio, mangime, fegato, rene

Per effettuare la conta vitale in piastra, 10 g di ciascun campione sono stati prelevati ed aggiunti a 90 mL di acqua peptonata sterile in sacchetti sterili per Stomacher. Gli omogenati sono stati ottenuti con Stomacher® 400 Circulator (International PBI, Milano, Italia) impostando il programma a 260 rpm per una durata di 2 minuti; in questo modo è stata ottenuta una diluizione 10^{-1} . Tutte le operazioni sono state eseguite in condizioni di sterilità. A partire da questo omogenato sono state allestite successive diluizioni seriali decimali da seminare in terreno agarizzato per la conta vitale. In dettaglio, con una micropipetta è stato prelevato 1 mL dalla diluizione 10^{-1} ed inserito in un tubo contenente 9 mL di acqua peptonata sterile: in questo modo è stata ottenuta una diluizione 10^{-2} . Per ottenere successive diluizioni è stato prelevato 1 mL dalla diluizione 10^{-2} ed inserito in altri 9 mL di acqua peptonata sterile, ottenendo 10^{-3} , e così via per le altre diluizioni.

Per i campioni di carne, salame, formaggio, fegato e rene è stata preparata solo la diluizione 10^{-2} in quanto, da precedenti prove, questi campioni avevano una ridotta carica batterica. Per i campioni di feci e mangime, invece, sono state fatte diluizioni seriali fino a 10^{-5} in quanto la carica batterica attesa era piuttosto elevata.

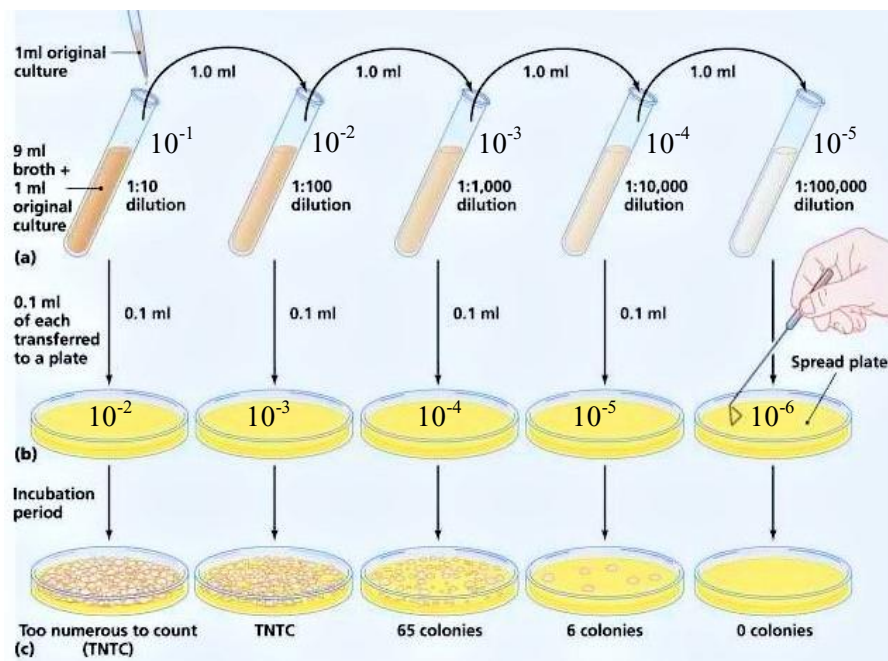


Figura 7 - Procedura di conta vitale mediante utilizzo di diluizioni seriali del campione e semina per spatolamento

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., Publishing as Benjamin Cummings
(Madigan et al., 2014; Brock, Biologia dei microrganismi, Ed. Pearson, 2014).

Da queste diluizioni è stata fatta la semina per spatolamento su piastre Petri con MacConkey: da ogni diluizione sono stati prelevati 100 μL e posti sul terreno solido nelle piastre; il campione è stato poi spatolato, con un'ansa ad L sterile, fino al completo assorbimento. Con la semina per spandimento si ottiene una ulteriore diluizione in piastra del campione seminato. Ad esempio, se si semina un campione che in provetta ha una diluizione 10^{-2} , in piastra otterremo una diluizione 10^{-3} (Figura 7). Le piastre così seminate sono state incubate a 37°C *overnight* (per una notte).

Il giorno successivo è stata svolta l'enumerazione delle "unità formanti colonia" (UFC) cresciute sul MacConkey. Sono state prese in considerazione piastre in cui si potevano contare dalle 30 alle 300 colonie: un numero di colonie inferiore a 30 non sarebbe valido dal punto di vista statistico, un numero di colonie superiore a 300 porterebbe ad una confluenza dei margini delle colonie che renderebbe impossibile la conta in quanto non si hanno colonie separate tra loro.

Il numero delle UFC/g di campione è stato successivamente determinato moltiplicando il numero di colonie contate nella piastra (30-300 colonie) per il fattore di diluizione della stessa piastra Petri. Ad esempio, se in una piastra è stato seminato 1 mL della diluizione 10^{-4} e crescono 185 colonie, avremo un risultato di 185×10^4 UFC/g, o meglio $1,85 \times 10^6$ UFC/g. In pratica, in 1 g o 1 mL di campione originale avevamo una carica di $1,85 \times 10^6$ cellule di *Enterobacteriaceae*.

Dall'omogenato iniziale, ottenuto con 10 g di campione e 90 mL di acqua peptonata, sono stati prelevati 100 μL per inoculare 10 mL di brodo LB addizionato in precedenza con ertapenem (0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in modo da inibire la crescita di batteri sensibili all'antibiotico. I tubi con terreno inoculato sono stati incubati a 37°C *overnight*. Il giorno seguente, i tubi di LB che presentavano intorbidimento sono stati usati per effettuare diluizioni seriali, fino a 10^{-4} , per poi seminare per spatolamento su MacConkey + ertapenem 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le piastre sono state incubate a 37°C *overnight*.

L'isolamento di *Enterobacteriaceae* resistenti è stato effettuato prelevando colonie morfologicamente diverse dalle piastre di MacConkey con antibiotico: questi isolati, poi, sono stati usati per il test di Hodge e per la determinazione della MIC.

2.4 Il test di Hodge e la determinazione della concentrazione minima inibente

Uno dei test fondamentali per stabilire la resistenza di un ceppo batterico ad un antibiotico è il test di Hodge modificato (MHT, Modified Hodge Test): è un saggio utile a

determinare la produzione di carbapenemasi in diversi ceppi isolati; è molto sensibile per *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi di classe A e classe D (Girlich et al., 2012).

Per prima cosa è stata eseguita la standardizzazione del ceppo ATCC® di *E. coli* 25922 (usato come ceppo di riferimento): è stata applicata una diluizione fino a raggiungere la concentrazione di 1×10^8 UFC/mL che corrisponde alla densità ottica (DO) di 0,1 (ad una lunghezza d'onda di 625 nm). Per ottenere questa diluizione è stata prelevata una colonia del ceppo con un tampone e stemperata in terreno MHII Broth. Attraverso lettura allo spettrofotometro è stata aggiunta la giusta quantità di brodo MHII fino al raggiungimento della DO desiderata. Dopo aver ottenuto la giusta concentrazione, è stata eseguita la semina sulla superficie di una piastra di MH agar con un tampone imbevuto nella sospensione batterica.

Successivamente è stato posizionato un dischetto di ertapenem, alla concentrazione di 10 µg, al centro della piastra (*Figura 8*). Due ceppi da testare sono stati poi prelevati con ansa da batteriologia ed usati per inoculare due dei tre raggi della piastra, attraverso semina radiale dal centro verso l'esterno. Il terzo raggio è stato strisciato con un ceppo resistente ad ertapenem, produttore di carbapenemasi, come controllo (ad esempio *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™, come visibile in *Figura 8*).

Una volta inoculate, le piastre sono state incubate a 37°C per una notte. Il giorno seguente è stato osservato il risultato del test analizzando la zona di intersezione tra l'isolato da testare ed il ceppo *E. coli* ATCC®25922:

- un alone di inibizione perfettamente circolare indica che il ceppo non produce carbapenemasi, in *Figura 8* possiamo osservare per esempio il ceppo numero 2;
- se si osserva, come nel caso dei ceppi 1 e 3 in *Figura 8*, un alone che si deforma attorno allo striscio dell'isolato da testare, abbiamo a che fare con ceppi resistenti, infatti la produzione di carbapenemasi permette al ceppo di *E. coli* ATCC® 25922 di crescere, senza essere inibito dall'ertapenem diffuso nell'agar, in prossimità del ceppo produttore.

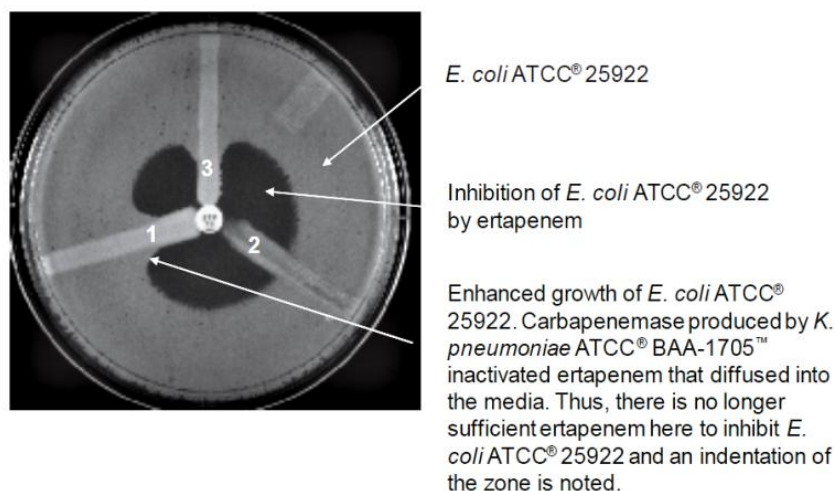


Figure 1. The MHT Performed on a Small MHA Plate.

(1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™, positive result;
 (2) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706™, negative result;
 and (3) a clinical isolate, positive result.

Figura 8 - Test di Hodge modificato

(©Clinical and Laboratory Standards Institute, Tests for Carbapenemases)

Un altro metodo usato per la verifica della resistenza ai carbapenemi degli isolati è stato la determinazione della MIC: analisi che permette di stabilire la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica visibile. Questa procedura è stata eseguita secondo le procedure standard del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), usando piastre da 96 pozzetti chiamate *microtiter* (Figura 9) nelle quali si effettuano microdiluzioni dell’antibiotico da testare, in terreno di coltura liquido MHII. In ogni riga viene inoculato un diverso ceppo (in ogni piastra si possono testare fino ad 8 isolati), mentre in ciascuna colonna sono presenti concentrazioni scalari dell’antibiotico da saggiare. Nel nostro caso le concentrazioni andavano da 8 a 0,0075 µg/mL. L’ultima colonna è stata lasciata senza antibiotico come controllo dell’avvenuta crescita dei ceppi.

Il range di concentrazioni di antibiotico che vengono testate dipende dai *breakpoints* (concentrazioni soglia) riportati per quel determinato antibiotico. Queste concentrazioni limite variano infatti per ogni singolo antibiotico e per gruppi di microrganismi, tenendo conto della concentrazione plasmatica di farmaco che può essere raggiunta senza la comparsa di effetti tossici per l’individuo. I *breakpoints* consentono di classificare il microrganismo in:

- *sensibile* quando l'infezione causata da quel ceppo può essere adeguatamente trattata con il dosaggio di un agente antimicrobico comunemente raccomandato per quel tipo di infezione;
- *intermedio* quando la crescita batterica è inibita solo al dosaggio massimo raccomandato; gli isolati batterici mostrano MIC corrispondenti a livelli sierici e tessutali di antibiotico per i quali l'efficacia potrebbe essere più bassa di quella registrata per gli isolati sensibili;
- *resistente* quando l'antibiotico dovrebbe essere utilizzato a dosaggi che risulterebbero tossici nell'organismo in quanto i ceppi non sono inibiti alle concentrazioni sistemiche di antimicrobico raggiungibili di solito con i normali dosaggi, questa categoria predice il possibile fallimento dell'antibiotico testato.

Per ertapenem, il *breakpoint* di resistenza per le *Enterobacteriaceae*, è pari ad una MIC $>1 \mu\text{g/mL}$ (fonte EUCAST), cioè se il ceppo da testare cresce nei pozzetti con concentrazione di ertapenem di 2, 4 o 8 $\mu\text{g/mL}$ vuol dire che è resistente ad ertapenem.

Gli isolati che sono resistenti o intermedi (cioè che mostrano una MIC rispettivamente maggiore od uguale a 1 $\mu\text{g/mL}$ nei confronti dell'ertapenem), sono stati valutati per la presenza di geni codificanti carbapenemasi per confermare la resistenza dei ceppi ai carbapenemi.

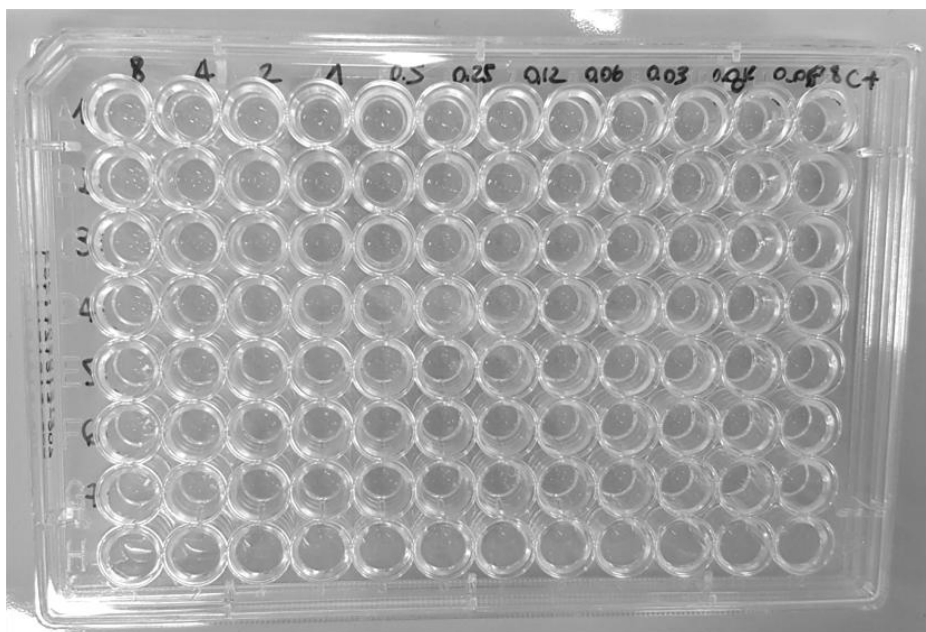


Figura 9 - Microtiter usata per la determinazione della MIC

L'antibiotico ertapenem preparato ad una concentrazione iniziale di 10000 µg/mL è stato diluito in brodo MHII fino a 16 µg/mL, concentrazione doppia rispetto alla più elevata che si vuole saggiare. Lavorando con una pipetta multicanale sono stati messi 50 µL di MHII in ogni pozzetto, ad eccezione della prima colonna. Successivamente 50 µL brodo MHII contenente 16 µg/mL sono stati inoculati in ogni pozzetto della prima e della seconda colonna. Le diluizioni seriali sono state fatte prelevando 50 µL dalla seconda colonna e mettendoli nella terza colonna della piastra; dopo aver mescolato, dalla terza colonna sono stati prelevati 50 µL e messi nella colonna successiva. Procedendo in questo modo sono state fatte tutte le colonne fino alla penultima, da questa sono stati prelevati 50 µL e scartati, in quanto l'ultima colonna serve per il controllo della crescita batterica e deve rimanere priva di antibiotico.

A questo punto i pozzetti sono stati inoculati con i diversi ceppi di *Enterobacteriaceae* precedentemente isolati: in ogni pozzetto si deve ottenere una concentrazione di cellule batteriche pari a 5×10^5 UFC/mL. Tutti i ceppi da testare sono stati, quindi, standardizzati in termini di concentrazione di cellule, mediante uso di spettrofotometro impostato alla lunghezza d'onda di 625 nm. Le colonie cresciute in piastra sono state diluite in MHII Broth fino a raggiungere una densità ottica (DO) compresa tra 0,08 e 0,12 (circa 0,1), corrispondente ad una concentrazione di circa 1×10^8 UFC/mL. Questa sospensione cellulare è stata diluita ulteriormente 1:100 mettendone 50 µL in 5 mL di MHII Broth. Una volta ottenuta la concentrazione desiderata di 1×10^6 UFC/mL, 50 µL della suddetta sospensione cellulare sono stati messi nei pozzetti che contenevano già 50 µL di MHII Broth + ertapenem, in ciascun pozzetto la concentrazione finale ottenuta è pari a 5×10^5 UFC/mL.

Come detto in precedenza, in ogni riga della *microtiter* è stato inoculato un diverso ceppo batterico, uno di questi è un ceppo di controllo: *E. coli* ATCC® 25922, sensibile all'ertapenem e di cui è noto il valore della MIC. La piastra è stata infine incubata a 37°C *overnight*.

Il giorno seguente, dopo aver verificato che il ceppo di controllo ATCC® 25922 rientrasse nei limiti previsti, la piastra è stata esaminata facendo riferimento ai valori riportati nelle tabelle fornite dal CLSI. È stata valutata la crescita dei diversi ceppi e la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osservava crescita visibile corrispondeva alla MIC. Un ceppo può essere definito resistente ad ertapenem se la MIC è maggiore di 1 µg/mL.

2.5 L'estrazione di DNA microbico totale dagli omogenati dei campioni

Come indicato nei protocolli, per l'estrazione di DNA microbico sono stati preparati dei pellet: 1,5 mL di omogenato di ciascun campione sono stati messi in provette eppendorf e poi centrifugati a massima velocità per 5 minuti. Dopo l'eliminazione del sovrantante sono stati conservati a -20°C.

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il kit "E.Z.N.A.® Soil DNA Kit" della Omega Bio-tek, seguendo le indicazioni riportate dal kit stesso.

Il DNA estratto da tutti i 54 campioni è stato poi quantizzato e conservato a -20°C, per la successiva ricerca di geni codificanti carbapenemasi attraverso Real-Time-PCR o Droplet-PCR.

2.6 La quantificazione del DNA estratto mediante spettrofotometro

La quantità di DNA estratta da ogni pellet di campione è stata determinata attraverso spettrofotometro usando lo *Spectrophotometer UV-1800* (Shimadzu Corporation, Giappone).

Per le analisi, 5 µL di DNA di ogni campione sono stati miscelati a 495 µL di acqua deionizzata sterile in una cuvetta in quarzo. La lettura allo spettrofotometro è stata svolta ad una lunghezza d'onda di 260 nm.

Per il calcolo della concentrazione di DNA è stata usata la seguente formula:

$$\text{DNA ng/}\mu\text{L} = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 100$$

Dove:

- il valore di assorbanza (Abs) uguale a 1 corrisponde alla concentrazione di DNA pari a 50 ng/µL;
- prima della lettura allo spettrofotometro il DNA è stato diluito 1:100, per cui 100 è il fattore di diluizione della soluzione.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Le conte vitali in piastra

Nelle seguenti tabelle vengono riportati i risultati delle conte vitali espressi come “unità formanti colonia” (UFC) per grammo di campione.

Tabella 8 - Risultati delle conte vitali in piastra dei campioni ottenuti da un’azienda zootecnica biologica, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DATA	UFC/g
3	Feci bovine	FB13	10-04-19	$1,4 \times 10^6$
4	Feci suine	FS13	10-04-19	$1,7 \times 10^6$
5	Carne bovina	CB13	10-04-19	$8,5 \times 10^4$
6	Carne suina	CS13	10-04-19	$1,5 \times 10^3$
7	Salame fegato	SAL13	10-04-19	$1,0 \times 10^2$
8	Formaggio	FOR13	10-04-19	$3,8 \times 10^3$
34	Feci bovine	FB17	28-05-19	$6,3 \times 10^6$
35	Feci suine	FS17	28-05-19	$9,3 \times 10^7$
36	Mangime bovino (fieno di medica)	MB17	28-05-19	$1,9 \times 10^6$
52	Carne bovina	CB19	23-07-19	$1,0 \times 10^5$
53	Salame	SAL19	23-07-19	-
54	Formaggio	FOR19	23-07-19	$3,5 \times 10^2$

Tabella 9 - Risultati delle conte vitali in piastra dei campioni ottenuti da due aziende zootecniche convenzionali, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DATA	UFC/g
1	Carne bovina	CB12	09-04-19	$1,0 \times 10^2$
2	Feci bovine	FB12	09-04-19	$7,5 \times 10^5$
9	Carne suina	CS14(1)	15-04-19	$2,8 \times 10^2$
10	Carne suina	CS14(2)	15-04-19	$2,5 \times 10^2$
11	Feci suine	FS14(1)	15-04-19	$3,4 \times 10^6$
12	Feci suine	FS14(2)	15-04-19	$6,1 \times 10^7$

Tabella 10 - Risultati delle conte vitali in piastra di campioni ottenuti da aziende suinicole convenzionali, progetto finanziato dalla Regione Marche

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DATA	UFC/g
13	Feci suine	FS15(1)	06-05-19	$1,4 \times 10^6$
14	Feci suine	FS15(2)	06-05-19	$3,2 \times 10^6$
15	Feci suine	FS15(3)	06-05-19	$2,9 \times 10^6$
16	Feci suine	FS15(4)	06-05-19	$2,7 \times 10^7$
17	Feci suine	FS15(5)	06-05-19	$1,6 \times 10^6$
18	Mangime suino (sfarinato di cereali)	MS15	06-05-19	$7,0 \times 10^5$
19	Carne suina	CS16(1)	08-05-19	$1,4 \times 10^3$
20	Carne suina	CS16(2)	08-05-19	$3,0 \times 10^5$
21	Carne suina	CS16(3)	08-05-19	$5,1 \times 10^4$
22	Carne suina	CS16(4)	08-05-19	$6,4 \times 10^3$
23	Carne suina	CS16(5)	08-05-19	$5,3 \times 10^4$
24	Rene suino	RES16(1)	08-05-19	$2,0 \times 10^2$
25	Rene suino	RES16(2)	08-05-19	$8,6 \times 10^4$
26	Rene suino	RES16(3)	08-05-19	$1,9 \times 10^4$
27	Rene suino	RES16(4)	08-05-19	$2,7 \times 10^4$
28	Rene suino	RES16(5)	08-05-19	$4,8 \times 10^4$
29	Fegato suino	FES16(1)	08-05-19	$1,5 \times 10^2$
30	Fegato suino	FES16(2)	08-05-19	$1,3 \times 10^5$
31	Fegato suino	FES16(3)	08-05-19	$1,0 \times 10^5$
32	Fegato suino	FES16(4)	08-05-19	$2,1 \times 10^4$
33	Fegato suino	FES16(5)	08-05-19	$1,3 \times 10^4$
37	Carne suina	CS18(1)	18-06-19	$4,1 \times 10^5$
38	Carne suina	CS18(2)	18-06-19	$1,2 \times 10^5$
39	Carne suina	CS18(3)	18-06-19	$6,7 \times 10^4$
40	Carne suina	CS18(4)	18-06-19	$3,3 \times 10^5$
41	Carne suina	CS18(5)	18-06-19	$3,2 \times 10^5$
42	Rene suino	RES18(1)	18-06-19	$1,2 \times 10^5$
43	Rene suino	RES18(2)	18-06-19	$1,4 \times 10^4$
44	Rene suino	RES18(3)	18-06-19	$6,6 \times 10^3$
45	Rene suino	RES18(4)	18-06-19	$9,5 \times 10^4$
46	Rene suino	RES18(5)	18-06-19	$1,1 \times 10^5$
47	Fegato suino	FES18(1)	18-06-19	$2,2 \times 10^4$
48	Fegato suino	FES18(2)	18-06-19	$1,1 \times 10^4$
49	Fegato suino	FES18(3)	18-06-19	$1,2 \times 10^4$
50	Fegato suino	FES18(4)	18-06-19	$1,6 \times 10^4$
51	Fegato suino	FES18(5)	18-06-19	$1,5 \times 10^5$

Le semine effettuate su terreno MacConkey senza aggiunta di antibiotico, avevano lo scopo di valutare la carica complessiva di *Enterobacteriaceae* per il campione in esame. I risultati evidenziavano una grande variabilità.

I due mangimi analizzati mostravano valori relativamente alti e pari a 10^5 - 10^6 UFC/g; tali valori erano simili a quelli riscontrati in letteratura per il fieno (10^4 - 10^6 UFC/g) usato come mangime per i bovini (Jacobson et al., 2002) e per il mangime a base di sfarinato di frumento (circa 10^4 UFC/g) utilizzato nell'allevamento dei suini (Burns et al., 2015).

Per quanto riguarda le feci, i valori erano piuttosto elevati e variabili tra 10^5 UFC/g e 10^7 UFC/g. Tali dati erano in linea con quelli riportati in letteratura per le feci umane, con valori compresi tra 10^5 e 10^9 UFC/g (Grall et al., 2017). Le analisi microbiologiche delle feci avevano lo scopo di determinare la carica batterica del campione per valutare poi l'eventuale presenza di *Enterobacteriaceae* resistenti all'ertapenem nell'animale in esame. Analizzare le feci di bovini e suini ci dà una indicazione importante della eventuale presenza di serbatoi di AR in questi animali da allevamento a partire dai quali, tramite le feci, può avvenire la diffusione di AR nell'ambiente e negli alimenti.

Analizzando i campioni di carne, si riscontravano valori variabili da 10^2 a 10^5 UFC/g. Ciò era probabilmente dovuto a una contaminazione di *Enterobacteriaceae* tra carne e ambiente o tra carne e contenuto intestinale degli animali al momento della macellazione, in quanto la carne del muscolo, fino al momento della macellazione, è sterile. È stato dimostrato che i momenti della scuoiatura e dell'eviscerazione sono punti chiave di contaminazione, in particolare per quanto riguarda le *Enterobacteriaceae*. La carne dell'animale macellato, durante questi processi, può venire in contatto con la pelliccia e con il contenuto dell'apparato digerente che potrebbe portare ad un aumento della carica batterica, in particolare di *Enterobacteriaceae* (Belluco et al., 2015).

Le concentrazioni di *Enterobacteriaceae* in campioni di fegato e rene erano per lo più simili e comprese tra 10^4 e 10^5 UFC/g; solo in 3 campioni su 20 la carica batterica era inferiore, e nell'ordine di 10^2 - 10^3 UFC/g. In letteratura non vengono riportati dati di conte di *Enterobacteriaceae* di campioni di fegato e reni, pertanto non è possibile effettuare un confronto con dati pubblicati da altri studi scientifici.

I prodotti trasformati come salame e formaggio hanno dimostrato avere una scarsa presenza di *Enterobacteriaceae*, infatti da un campione di salame (SAL 19) non si è riscontrata crescita di *Enterobacteriaceae* in piastra, negli altri 3 campioni la carica era compresa tra 10^2 e 10^3 UFC/g. Nel caso del salame la crescita batterica viene inibita sia dall'aggiunta di sale e dal tempo di stagionatura che permette all'insaccato di perdere acqua,

sia dalla competizione con l'eventuale presenza di colture *starter*. Nel formaggio la presenza di *Enterobacteriaceae* viene inibita a favore di altri microrganismi presenti nel latte stesso o aggiunti come coltura *starter*. Questi processi di trasformazione giustificano la scarsa carica di *Enterobacteriaceae*.

3.2 Gli isolati antibiotico-resistenti

La campagna di isolamento di batteri appartenenti alle *Enterobacteriaceae* cresciute su MacConkey addizionato di ertapenem ha portato all'ottenimento di 149 isolati in quanto da ogni campione analizzato si otteneva da 1 a 4 colonie diverse per morfologia. Tutti gli isolati sono stati testati mediante MHT.

I risultati del MHT indicavano che un solo isolato era resistente a ertapenem: l'isolato chiamato "I" in *Figura 10* ed ottenuto dal campione con codice 33, corrispondente a fegato di suino [FES16(5)], campionato da una azienda convenzionale.

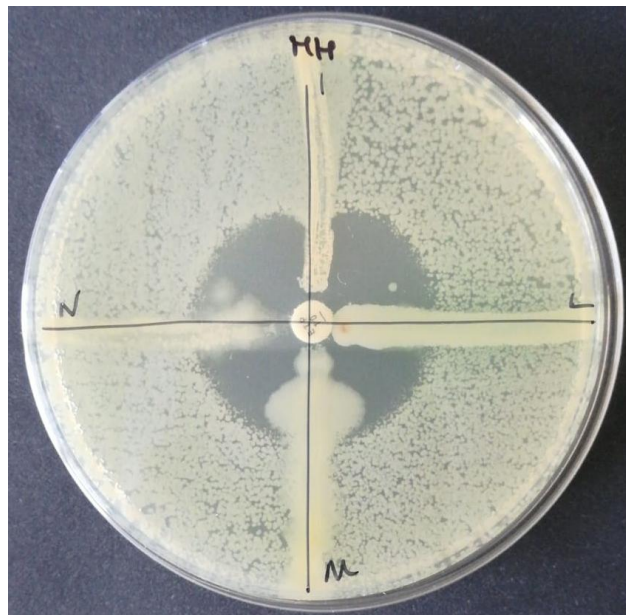


Figura 10 - Piastra con test di Hodge dopo l'incubazione in cui è stata riscontrata la resistenza del ceppo isolato da FES16(5) indicato come "I" (in alto)

Per quanto riguarda la determinazione della MIC, gli isolati testati mostravano valori compresi tra 0,25 e 1 µg/mL ad indicare che erano sensibili all'ertapenem (< 1 µg/mL) o con sensibilità intermedia (pari a 1 µg/mL), eccetto l'isolato "I" proveniente da FES16(5) che mostrava una MIC pari a 4 µg/mL. Pertanto si confermava la resistenza all'ertapenem di questo isolato ottenuto da fegato di suino, già rilevata con il MHT. Da questo isolato, è stato inoltre estratto il DNA totale, amplificato per i geni per le carbapenemasi che poi, sottoposto a sequenziamento, ha confermato la presenza del gene *bla_{OXA}*. L'isolato "I" è stato successivamente identificato dal gruppo di microbiologia del DiSVA come un ceppo di *Aeromonas* spp. utilizzando sistemi biochimici (galleria API 20E, Biomerieux) e mediante spettrometria di massa (MALDI-TOF).

Il fegato è un importante organo filtrante dell'organismo, che ha anche il compito di attuare, grazie ai macrofagi epatici (o cellule di Kupffer), la rimozione di batteri, di sostanze tossiche e di cellule danneggiate che sono presenti nel sangue, che giunge al fegato attraverso il sistema portale epatico e sistemico. In caso di malattie epatiche (cirrosi, epatiti), infatti, viene meno questa funzione ed aumenta il rischio di batteriemie e di infezioni (Balmer et al., 2014). La contaminazione riscontrata su un campione di fegato da parte di un isolato di *Aeromonas* resistente all'ertapenem potrebbe essere imputabile ad una contaminazione ambientale casuale o derivare dal suino esaminato. Saranno necessari ulteriori campionamenti ed analisi su campioni di fegato di suino di quell'allevamento ed altri allevamenti per verificare che tale contaminazione non sia stato un evento casuale.

Aeromonas è un genere appartenente alla famiglia delle *Aeromonadaceae*, ubiquitario in natura e con caratteristiche nutrizionali, fisiologiche e morfologiche simili ai componenti della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. A questo genere appartengono batteri noti come importanti agenti eziologici di infezioni gastrointestinali e altre malattie umane. Tra le specie di *Aeromonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii biovars veronii* ed *Aeromonas sobria* sono tra le più diffuse in ambito medico. Sia individui sintomatici che asintomatici possono presentare *Aeromonas* nel loro tratto intestinale. Sebbene le infezioni dovute ad *Aeromonas* siano auto-limitanti, il trattamento con antibiotici è spesso necessario per limitare la durata della malattia, in particolare nei giovani, in soggetti anziani ed in individui immunocompromessi. La suscettibilità agli antibiotici varia in base all'area geografica e alle specie di *Aeromonas* testata. Negli ultimi anni, è stata notata un aumento della resistenza alle cefalosporine di terza generazione a causa della produzione di β-lattamasi e β-lattamasi ad ampio spettro d'azione. Inoltre, la maggior parte degli isolati risultano sensibili alle tetracicline e chinoloni (Bhaskar et al., 2015). A causa dell'abuso di

antibiotici ad ampio spettro nel contesto clinico, in agricoltura ed in acquacoltura, abbiamo assistito ad un aumento della resistenza agli antibiotici tra i ceppi di *Aeromonas* spp. più importanti da un punto di vista medico (Skworet al., 2014).

Nel 2017, Anandan e collaboratori hanno studiato degli isolati di *Aeromonas* resistenti ai carbapenemi e su questi hanno condotto esperimenti di coniugazione per determinare la trasmissibilità della resistenza. Questo studio ha dimostrato la sempre maggiore diffusione della resistenza ai carbapenemi tra specie del genere *Aeromonas* e l'importanza di elementi genetici mobili come i plasmidi nello scambio di determinanti di resistenza tra specie. Alcuni isolati studiati in questa ricerca hanno dimostrato di possedere il gene *bla*_{OXA-181} (β -lattamasi di classe D) ed è interessante notare che questo gene è stato identificato in associazione con il trasposone Tn2013 nel plasmide pKP3-A. Il gene della resistenza era trasmissibile in presenza di imipenem (Anandan et al., 2017).

È inoltre importante sottolineare che, anche se la carne, il fegato ed i reni degli animali da allevamento vengono cotti prima del consumo e quindi i batteri vengono uccisi, il loro DNA, e quindi anche gli eventuali geni di resistenza, potrebbero rimanere nell'alimento e raggiungere l'intestino umano. Qui i batteri della flora intestinale potrebbero acquisirli e di conseguenza diventare resistenti.

I dati ottenuti finora indicano una bassissima incidenza di batteri resistenti ai carbapenemi nei campioni ottenuti da alcune filiere bovine e suine della Regione Marche, in quanto è stato rilevato un solo isolato appartenente al genere *Aeromonas* resistente a ertapenem (ottenuto da un campione di fegato di suino) su 149 isolati totali. La bassa prevalenza di EPC nei campioni analizzati con la presente Tesi di Laurea è in linea con quanto riportato da Pulss e collaboratori (2017) che hanno isolato solo due ceppi di *Escherichia coli* con gene *bla*_{OXA-181} su 114 isolati ottenuti da campioni fecali di suini allevati da una azienda italiana. Sebbene l'uso dei carbapenemi non sia autorizzato negli allevamenti e le incidenze complessive di resistenze ai carbapenemi nei suini siano basse, anche i suini possono ospitare ceppi di *Enterobacteriaceae* multi-resistenti con resistenze mediate da plasmidi (Pulss et al., 2017).

Dall'analisi colturale di ulteriori campioni e dalle analisi molecolari per rilevare l'eventuale presenza di geni di resistenza ai carbapenemi sarà possibile delineare un quadro più completo ed informativo riguardo l'incidenza di queste resistenze trasmissibili nelle filiere prese in considerazione.

3.3 La quantificazione del DNA microbico

Il DNA totale microbico estratto da ciascun campione è stato quantificato mediante lo spettrofotometro; i valori di assorbanza ottenuti sono stati usati per calcolare la quantità di DNA espressa in ng/ μ L (*Tabelle 11, 12 e 13*).

Tabella 11 - Risultati della quantificazione di DNA microbico ottenuti attraverso lettura allo spettrofotometro di DNA estratto da campioni di un'azienda zootecnica biologica, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DNA (ng/μL)
3	Feci bovine	FB13	60
4	Feci suine	FS13	60
5	Carne bovina	CB13	20
6	Carne suina	CS13	10
7	Salame fegato	SAL13	15
8	Formaggio	FOR13	5
34	Feci bovine	FB17	55
35	Feci suine	FS17	130
36	Mangime bovino (fieno di medica)	MB17	10
52	Carne bovina	CB19	10
53	Salame	SAL19	5
54	Formaggio	FOR19	350

Tabella 12 - Risultati della quantificazione di DNA microbico ottenuti attraverso lettura allo spettrofotometro di DNA estratto da campioni di due aziende zootecniche convenzionali, progetto finanziato dalla Fondazione Cariverona

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DNA (ng/μL)
1	Carne bovina	CB12	15
2	Feci bovine	FB12	85
9	Carne suina	CS14(1)	5
10	Carne suina	CS14(2)	20
11	Feci suine	FS14(1)	85
12	Feci suine	FS14(2)	50

Tabella 13 - Risultati della quantificazione di DNA microbico ottenuti attraverso lettura allo spettrofotometro di DNA estratto da campioni di aziende suinicole convenzionali, progetto finanziato dalla Regione Marche

CODICE	CAMPIONE	SIGLA	DNA (ng/μL)
13	Feci suine	FS15(1)	140
14	Feci suine	FS15(2)	80
15	Feci suine	FS15(3)	85
16	Feci suine	FS15(4)	110
17	Feci suine	FS15(5)	145
18	Mangime suino (sfarinato di cereali)	MS15	65
19	Carne suina	CS16(1)	15
20	Carne suina	CS16(2)	20
21	Carne suina	CS16(3)	5
22	Carne suina	CS16(4)	20
23	Carne suina	CS16(5)	50
24	Rene suino	RES16(1)	210
25	Rene suino	RES16(2)	130
26	Rene suino	RES16(3)	125
27	Rene suino	RES16(4)	190
28	Rene suino	RES16(5)	120
29	Fegato suino	FES16(1)	245
30	Fegato suino	FES16(2)	335
31	Fegato suino	FES16(3)	200
32	Fegato suino	FES16(4)	215
33	Fegato suino	FES16(5)	405
37	Carne suina	CS18(1)	5
38	Carne suina	CS18(2)	10
39	Carne suina	CS18(3)	10
40	Carne suina	CS18(4)	5
41	Carne suina	CS18(5)	20
42	Rene suino	RES18(1)	115
43	Rene suino	RES18(2)	140
44	Rene suino	RES18(3)	175
45	Rene suino	RES18(4)	170
46	Rene suino	RES18(5)	145
47	Fegato suino	FES18(1)	285
48	Fegato suino	FES18(2)	130
49	Fegato suino	FES18(3)	140
50	Fegato suino	FES18(4)	265
51	Fegato suino	FES18(5)	290

Come si può osservare, dai risultati è emersa una grande variabilità nella resa in termini di quantità di DNA microbico estratta, si va da un minimo di 5 ad un massimo di 405 ng/μL. All'interno di questa variabilità, però, la quantità di DNA riscontrata nelle diverse matrici potrebbe essere associata, in alcuni casi, alla natura del campione. Ad esempio, i due campioni di salame avevano rispettivamente 15 (salame di fegato) e 5 ng/μL, mostrando così una bassa resa di DNA microbico estratto che potrebbe essere correlata anche alla bassa carica batterica riscontrata.

I due campioni di formaggio avevano rese molto diverse: 5 ng/μL e 350 ng/μL.

Per quanto riguarda i campioni di carne, la resa di DNA microbico variava da un minimo di 5 ad un massimo di 50 ng/μL, mentre i campioni di fegato e rene contenevano da 115 a 405 ng/μL di DNA microbico.

La concentrazione di DNA microbico nelle feci, invece, variava da 50 a 145 ng/μL.

Per quanto riguarda i campioni di mangime, è stato estratto DNA microbico con una concentrazione pari a 10 ng/μL (mangime bovino), e 65 ng/μL (mangime suino).

È interessante sottolineare che dal campione FES16(5) (codice 33), da cui si è ottenuto l'unico isolato resistente ad ertapenem, è stato estratto il maggiore quantitativo di DNA tra tutti i campioni analizzati nella presente ricerca; questo dato potrebbe essere interpretato come una forte contaminazione microbica di questa matrice.

Questi DNA microbici estratti verranno analizzati mediante metodi molecolari avanzati per verificare l'eventuale presenza di geni di resistenza in tutte le matrici in esame. Tale screening è di fondamentale importanza in quanto va ad integrare l'approccio coltura-dipendente, principale oggetto della presente Tesi di Laurea. Infatti, da una prima analisi mediante Droplet-PCR (svolta presso l'Università di Verona) di 2 campioni di DNA microbico estratto da FB13 e FS13 è stato possibile ottenere un primo dato molto interessante. È stata infatti rilevata la presenza del gene *bla_{KPC}* in un campione di feci bovine da allevamento biologico (FB13) risultato negativo per l'isolamento di batteri resistenti a ertapenem. Tale screening verrà ampliato a tutti i campioni oggetto della presente Tesi di Laurea, anche per verificare l'eventuale presenza dei geni *bla_{VIM}*, *bla_{OXA}* e *bla_{NDM}*. Sarà così possibile avere un quadro completo delle resistenze trasmissibili ai carbapenemi nelle filiere in esame.

CONCLUSIONI

Lo studio svolto nella presente Tesi di Laurea rappresenta un primo contributo per definire l'eventuale coinvolgimento di allevamenti di bovini e suini della regione Marche nella diffusione della resistenza ai carbapenemi.

È stata presa in considerazione la filiera completa di bovini e suini a partire dal mangime, fino al controllo dell'animale attraverso le feci, e poi analisi di prodotti freschi come la carne, e di prodotti trasformati come il formaggio, nel caso dei bovini, ed il salame, nel caso dei suini. Per quanto riguarda i suini, sono stati analizzati anche fegato e reni in quanto analizzare questi organi rappresenta un ulteriore controllo dell'animale; inoltre, fegato e reni di suino vengono anche utilizzati come alimenti nella dieta umana.

Dai dati emersi dal presente studio, sembrerebbe che le filiere bovine e suine della Regione Marche prese in considerazione non rappresentino un serbatoio di resistenza ai carbapenemi, in quanto è stato rilevato un solo isolato appartenente al genere *Aeromonas* resistente ad ertapenem (ottenuto da un campione di fegato di suino) su 149 isolati totali.

Tuttavia, è necessaria anche una analisi diretta degli estratti di DNA microbici ottenuti dai campioni in esame, mediante analisi molecolari volte a verificare la presenza di geni di resistenza ai carbapenemi indipendente dalla presenza di microrganismi resistenti. Infatti, un'analisi molecolare preliminare ha evidenziato la presenza del gene *bla_{KPC}* in un campione di feci bovine da allevamento biologico (FB13) risultato negativo per l'isolamento di batteri resistenti ad ertapenem. Geni di resistenza come *bla_{KPC}* potrebbero derivare dal DNA di cellule batteriche presenti nel campione in esame, ma lisate, morte o in uno stato vitale non coltivabile e pertanto non rilevabili mediante le tecniche colturali. La presenza di tali geni costituisce comunque un rischio per la salute umana in quanto, se ingeriti, potrebbero essere acquisiti dalle cellule del microbiota intestinale umano che diventerebbero così resistenti ai carbapenemi. In questo modo il microbiota intestinale umano rappresenterebbe un serbatoio di antibiotico-resistenze che potrebbero essere potenzialmente trasmesse anche a batteri patogeni rendendo poi difficile, o a volte impossibile, debellare le infezioni sostenute da questi batteri resistenti. Tali analisi coltura-indipendenti verranno estese a tutti i campioni di DNA finora estratti e saranno necessari anche ulteriori campionamenti ed analisi coltura-

dipendenti ed indipendenti per avere un quadro completo delle resistenze trasmissibili ai carbapenemi nelle filiere in esame.

Infine, si sottolinea l'importanza di tali ricerche per individuare i serbatoi di antibiotico-resistenze trasmissibili e per capire i meccanismi coinvolti nella diffusione delle resistenze al fine di attuare specifiche strategie di contrasto. In generale, dal presente studio emerge la necessità di sensibilizzare l'opinione pubblica e tutti i soggetti coinvolti in ambito zootecnico, medico e ambientale riguardo un uso prudente degli antibiotici, soprattutto se utilizzati sia in terapia umana che animale.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutte le persone, gli amici ed i compagni di corso che ho incontrato durante questi tre anni, ognuno di loro ha reso questa esperienza indimenticabile.

Un particolare ringraziamento va alla Dott.ssa Cristiana Garofalo perché mi ha permesso di portare avanti le ricerche ed ha fornito un prezioso aiuto nella stesura della presente Tesi di Laurea. Grazie a lei ho approfondito tematiche molto interessanti, che mi hanno arricchito sia personalmente che professionalmente. Inoltre ringrazio molto la Dott.ssa Vesna Milanović che è stata sempre al mio fianco durante le ricerche in laboratorio ed è sempre stata disponibile per ogni domanda o chiarimento.

Ringrazio il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) ed in particolare la Prof.ssa Carla Vignaroli e la Dott.ssa Serena Simoni, per il loro prezioso contributo nella ricerca delle resistenze e per l'aiuto nella stesura di questo elaborato.

Non posso fare a meno di esprimere la mia gratitudine verso la Dott.ssa Tullia Matricardi, la Dott.ssa Antonietta Maoloni ed il Dott. Luca Belleggia che sono stati sempre presenti durante le giornate in laboratorio e, grazie al loro fondamentale aiuto ed ai loro consigli, ho concluso al meglio questa bellissima esperienza.

Grazie anche alla Prof.ssa Maria Federica Trombetta ed alla Prof.ssa Marina Pasquini per aver effettuato tutti i campionamenti necessari per svolgere la presente ricerca.

Ringrazio per ultimi, ma non per importanza, Daniele, Maria Laura, Giorgio, Stefania, Michele e tutta la mia famiglia, perché senza il loro supporto e i loro consigli non sarei mai riuscita a portare a termine questo percorso di Laurea Triennale.

Grazie.

BIBLIOGRAFIA

Abdallah, H. M., Reuland, E. A., Wintermans, B. B., Al Naiemi, N., Koek, A., Abdelwahab, A. M., et al. (2015). Extended-spectrum b-Lactamases and/or carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in zagazig, Egypt. PLoS ONE 10:e0136052 doi: 10.1371/journal.pone.0136052.

Anandan S., Gopia R., Ragupathia N. K. D., Sethuvela D. P. M., Gunasekarana P., Waliab K., Veeraraghavana B. (2017). First report of blaOXA-181-mediated carbapenem resistance in *Aeromonas caviae* in association with pKP3-A: Threat for rapid dissemination. Journal of Global Antimicrobial Resistance 10 (2017) 310–314.

Balmer M.L., Slack E., De Gottardi A., Lawson M.A.E., Hapfelmeier S., Miele L., Grieco A. (2014). The Liver May Act as a Firewall Mediating Mutualism Between the Host and Its Gut Commensal Microbiota. *Science Translational Medicine* 21 May 2014:Vol. 6, Issue 237, pp. 237ra66DOI: 10.1126/scitranslmed.3008618.

Baquero F, Martínez JL, Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:260-5.

Belluco S., Barco L., Roccato A., Ricci A. (2015). Variability of *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* counts on pig carcasses: A systematic review. *Food Control* 55 (2015) 115e126.

Bhaskar M, Dinoop KP, Mandal J. Characterization of ceftriaxone-resistant *Aeromonas* spp. isolates from stool samples of both children and adults in Southern India. *J Health Popul Nutr* 2015;33:26.

Burns A. M., Lawlor P. G., Gardiner G. E., McCabe E. M., Des Walsh, Mohammed M., Grant J., Duffy G. (2015). *Salmonella* occurrence and *Enterobacteriaceae* counts in pig feed

ingredients and compound feed from feed mills in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 121 (2015) 231–239.

Canıça, M., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Clemente, L., Gomes-Neves, E., Poeta, P., et al. (2015). Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. *Res. Microbiol.* 166, 594–600. doi: 10.1016/j.resmic.2015.07.009.

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M., et al. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 413–431. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x.

Chen PL, Ko WC, Wu CJ. Complexity of b-lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *J Microbiol Immunol Infect* 2012;45:398–403.

Comunian R., Daga E., Dupre I., Paba A., Devirgiliis C., Piccioni V., Perozzi G., Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L., De Lorentiis A. & Giraffa G. (2010). – Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 138, 151–156.

Doi, Y. and Paterson, D. L. (2015). Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 36, 74–84. doi: 10.1055/s-0035-1544208.

EFSA BIOHAZ Panel (2013). Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. *EFSA J.* 11:3501. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3501.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.

FAO/WHO/OIE., 2008. Joint FAO/WHO/OIE expert meeting on critically important antimicrobials. Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26-30 November 2007. FAO, Rome, Italy, and WHO, Geneva, Switzerland.

Fernando, D. M., Tun, H. M., Poole, J., Patidar, R., Li, R., Mi, R., et al. (2016). Detection of antibiotic resistance genes in source and drinking water samples from a first nations community in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4767–4775 doi: 10.1128/AEM.00798-16.

Fischer, J., San José M., Roschanski, N., Schmogger, S., Baumann, B., Irrgang, A., et al. (2017). Spread and persistence of VIM-1 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in three German swine farms in 2011 and 2012. *Vet. Microbiol.* 200, 118–123. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.026.

Girlich D, Poirel L, Nordmann P (2012). – Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb; 50(2): 477–479. Doi: 10.1128/JCM.05247-11.

Guerra, B., Fischer, J., and Helmuth, R. (2014). An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet. Microbiol.* 171, 290–297. doi: 10.1016/j.vetmic.2014. 02.001.

Grall N., Lazarevic V., Gaia N., Couffignal C., Laouenan C., Ilic-Habensus E., Wieder I., Plesiat P., Angebault C., Bougnoux M.E., Armand-Lefevre L., Andremont A., Duval X., Schrenzel J. (2017). Unexpected persistence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in the faecal microbiota of hospitalized patients treated with Imipenem. *International Journal of Antimicrobial Agents* 50 (2017) 81–87.

Grundmann, H., Livermore, D. M., Giske, C. G., Canton, R., Rossolini, G. M., Campos, J., et al. (2010). Carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 15:19711. doi: 10.2807/ese.15.46.19711-en.

Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011;14:236-43.

Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Sci World J* 2012;2012:625023.

Jacobson L. H., Nagle T. A., Gregory N. G., Bell R. G., Le Roux G., Haines J. M. (2002). – Effect of feeding pasture-finished cattle different conserved forages on *Escherichia coli* in the rumen and faeces. *Meat Science* 62 (2002) 93–106.

Köck R., Daniels-Haardt I., Becker K., Mellmann A., Friedrich A. W., Mevius D., Schwarz S., Jurke A. (2018). – Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing and companion animals: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* 24 (2018) 1241-1250.

Li X.H., Alvarez A., Harper W.J. & Wang H.H. (2011). – Persistent, toxin-antitoxin system-independent tetracycline resistance-encoding plasmid from a dairy *Enterococcus faecium* isolate. *Appl. environ. Microbiol.*, 77 (20), 7096–7103.

Madigan M. T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A. (2016). *Brock, Biologia dei microrganismi*.

Milanović V, Osimani A, Roncolini A, Garofalo C, Aquilanti L, Pasquini M, Tavoletti S, Vignaroli C, Canonico L, Ciani M, Clementi F (2018). – Investigation of the Dominant Microbiota in Ready-to-Eat Grasshoppers and Mealworms and Quantification of Carbapenem Resistance Genes by qPCR, *Microbiol.* 9:3036. Doi: 10.3389/fmicb.2018.03036.

Miriagou, V., Tzouvelekis, L. S., Rossiter, S., Tzelepi, E, Angulo, F. J., and Whichard, J.M. (2003). Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1297–1300.

Morrison, B. J. and Rubin, J. E. (2015). Carbapenemase producing bacteria in the food supply escaping detection. *PLoS ONE*. 10: e0126717. Doi: 10.1371/journal.pone.0126717.

Nordmann, P., Naas, T., and Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1791–1798. doi: 10.3201/eid1710.110655.

Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012;18(5):263-72.

Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N., and Miriagou, V. (2012). European network on carbapenemases, identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 432–438. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x.

OIE, World Organization for Animal Health (2015). OIE list of antimicrobial agents of veterinary medicine 2015. A disposizione al link: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf.

Poulakou G, Bassetti M, Righi E, Dimopoulos G. Current and future treatment options for infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Future Microbiol* 2014;9:1053-69.

Pulss S., Semmler T., Prenger-Berninghoff E., Bauerfeind R., Ewers C. (2017). – First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *International Journal of Antimicrobial Agents* 50 (2017) 232–236.

Sabbatucci M, Iacchini S, Iannazzo S, Farfusola C, Marella AM, Bizzotti V, D’Ancona F, Pezzotti P, Pantosti A. Sorveglianza nazionale delle batteriemie da enterobatteri produttori di carbapenemasi. Rapporto 2013-2016. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/18).

Skwor T, Shinko J, Augustyniak A, Gee C, Andraso G. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic cephalosporin- and

tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:841–8.

Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., and Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol. Rev.* 25, 682–707. doi: 10.1128/CMR.05035-11.

Wang H.H. (2009). – Commensal bacteria, microbial ecosystems and horizontal gene transmission: adjusting our focus for strategic breakthroughs against antibiotic resistance. In *Food borne microbes: shaping the host ecosystems* (L. Jaykus, H.H. Wang & L.S. Schlesinger, eds). ASM Press, Washington, DC, 267–281.

Wang H.H., McEntire J.C., Zhang L., Li X., Doyle M. (2012). – The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2012, 31 (1), 249-260.

Webb, H. E., Bugarel, M., den Bakker, H. C., Nightingale, K. K., Granier, S. A., Scott, H.M., et al. (2016). Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the high plains region of the USA. *PLoS ONE*:e0147363. doi: 10.1371/journal.pone.0147363.

Woodford, N., Wareham, D. W., Guerra, B., and Teale, C. (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 287–291. doi: 10.1093/jac/ dkt392.

Yikrazuul, 2009, Wikipedia(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbapenem.svg>).

Zhanel, G.G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D.J., Noreddin, A.M., Karlowsky, J.A., 2007. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 67, 1027–1052.

Zhang, R., Chan, E.W, Zhou, H., and Chen, S. (2017). Prevalence and genetic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* strains in China. *Lancet*. 17, 256–257. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30072-5.

Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M., and Stephan, R. (2013). Characteristics of extended-spectrum b-lactamase- and carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae* isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3021–3026. doi: 10.1128/AEM.00 054-13.

Zurfluh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Klumpp, J., and Stephan, R. (2015). First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 4:38. doi: 10.1186/s13756-015-0080-5.

Zurfluh, K., Hindermann, D., Nüesch-Inderbinen, M., Poirel, L., Nordmann, P., and Stephan, R. (2016). Occurrence and features of chromosomally encoded carbapenemases in Gram-negative bacteria in farm animals sampled at slaughterhouse level. *Kurzmitteilungen* 6, 457–460. doi: 10.17236/sat00072.