



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea in Scienze biologiche

Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community.

Resistenza agli antibiotici in una comunità amazzonica molto remota.

Tesi di Laurea di:
Matteo Gambini

Docente Referente:
Eleonora Giovanetti

Sessione autunnale

Anno Accademico 2018/2019

Popolazione analizzata

- ❑ La popolazione oggetto dello studio è rappresentata dagli abitanti di «Angaiza», una comunità molto isolata di indiani Chayahuita situata nella provincia «Alto Amazonas» del Perù. L'Area urbana più vicina è la città di «Yurimaguas».
- ❑ La popolazione vive nelle tipiche capanne amazzoniche costituite da un'unica stanza, senza fognature ed elettricità. L'acqua piovana, raccolta localmente, rappresenta l'unica fonte di approvvigionamento idrico. Le principali attività sono l'agricoltura, la caccia e l'allevamento.
- ❑ Quando è iniziato lo studio, la comunità era composta da un totale di 113 individui riuniti in 15 famiglie.
- ❑ Complessivamente sono stati studiati 89 abitanti (48 maschi e 41 femmine, fascia d'età 0-59 anni).
- ❑ Da ciascun individuo sono stati raccolti campioni di feci e di urine da sottoporre alle analisi microbiologiche



Immagine tratta da: Hermes Ecoturismo

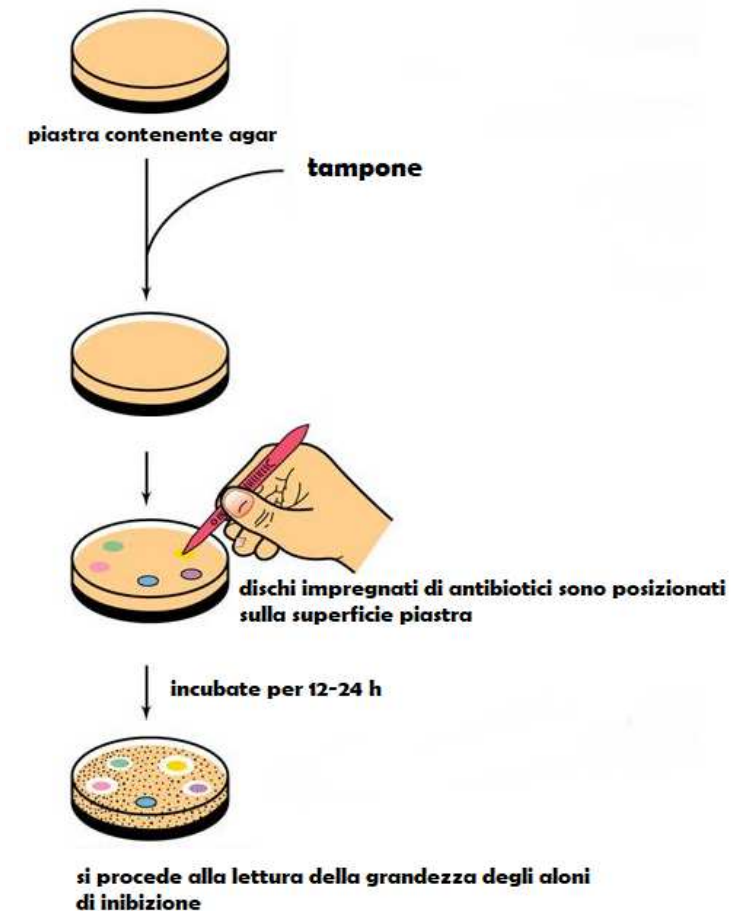
Saggio per il rilevamento di sostanze antibatteriche nelle urine

- ❑ Tutti i campioni di urina sono stati testati per rilevare la presenza di sostanze con attività antibatterica mediante un test qualitativo di diffusione in agar.
- ❑ Per ciascun campione, un dischetto impregnato di urina è stato posizionato sulla superficie di due piastre di Mueller–Hinton agar inoculate con *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* rispettivamente.
- ❑ Dopo un'incubazione overnight a 37 °C, le piastre sono state analizzate per verificare la comparsa di aloni di inibizione attorno al dischetto, indicativa della presenza nel campione di urina di sostanze con attività antibatterica.



Screening per la presenza di ceppi di *E. coli* resistenti nel microbiota commensale.

- ❑ I tamponi fecali sono stati seminati su piastre MacConkey agar in modo da ottenere una crescita batterica uniforme e i dischetti contenenti antibiotici sono posizionati direttamente sulla superficie della piastra.
- ❑ Gli antibiotici saggiati includevano: ampicillina, ceftriaxone, tetraciclina, trimetoprim/sulfametossazolo, cloramfenicolo, streptomina, kanamicina, gentamicina, amikacina, acido nalidissico e ciprofloxacina.
- ❑ Dopo un'incubazione di 12-24 ore a 37 °C, le piastre venivano ispezionate e osservati i diametri degli aloni di inibizione.
- ❑ In accordo con i «breakpoints» di ciascun antibiotico ed i criteri interpretativi:
 - ❑ Aloni di inibizione assenti o ridotti suggerivano la presenza di batteri antibiotico-resistenti nella flora microbica fecale predominante.
 - ❑ Colonie isolate, con la tipica morfologia di *E. coli*, cresciute all'interno degli aloni di inibizione prodotti da ciascun antibiotico erano considerate putativamente resistenti e sottoposte a identificazione mediante API20E e test di sensibilità antimicrobica con il metodo standard di diffusione da dischetto. *E. coli* ATCC 25922 è stato usato come ceppo di riferimento nei test di sensibilità



Analisi molecolare dei ceppi antibiotico-resistenti

- ❑ Complessivamente sono stati sottoposti ad analisi molecolare 111 ceppi antibiotico-resistenti di E. coli isolati da 89 soggetti.
- ❑ L'assegnazione degli isolati ai quattro principali gruppi filogenetici di E. coli (A, B1, B2 e D) è stata ottenuta sfruttando una tecnica di PCR Multiplex descritta da Clermont et al.
- ❑ La genotipizzazione è stata eseguita tramite la metodica «Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD».
- ❑ Mediante PCR sono stati ricercati i seguenti determinanti di resistenza:
 - ❑ blaTEM-like (beta-lattamici);
 - ❑ tet(A), tet(B), tet(C) e tet(D) (tetraciclina);
 - ❑ catI (fenicolo)
 - ❑ dfrA8 (trimethoprim);
 - ❑ sul1 e sul2 (sulfonamide).
- ❑ Mediante ibridazione con la sonda specifica per int1 si è ricercata la presenza di integroni di classe 1.
- ❑ L'analisi plasmidica è stata eseguita mediante «restriction fragment length polymorphism, (RFLP)» dopo restrizione con PstI or EcoRI.

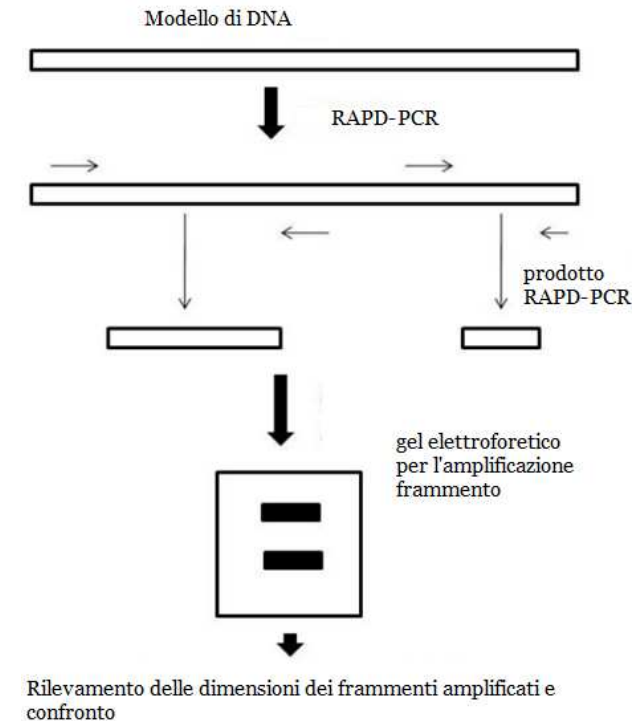


Immagine tratta da: researchgate.net

Prevalenza (%) di soggetti con E. coli commensali antibiotico-resistenti ad Angaiza e Alto Los Zarzos (due comunità remote del Perù e della Bolivia, rispettivamente) ed a Yurimaguas (area urbana).

Antibiotici	Individui sani			Bambini sani di età compresa tra 6 e 72 mesi (n)=individui in cui e.coli è predominante flora		Valore P
	Angaiza (n =89)	Alto Los Zarzos (n =108)	valore P	Angaiza (n =35)	Yurimaguas (n =797)	
Tetraciclina	87	64	<0.001	86 (46)	89 (71)	N.S. (<0.001)
Ampicillina	75	58	0.01	86 (40)	92 (76)	N.S. (<0.001)
SXT	69	50	0.008	77 (34)	89 (72)	0.03 (<0.001)
Streptomicina	66	N.D.	N.A.	83 (20)	71 (50)	N.S. (<0.001)
Cloramfenicolo	53	41	N.S.	57 (23)	69 (42)	N.S. (0.03)
Kanamicina	6	5	N.S.	11 (0)	22 (8)	N.S.
Gentamicina	1	0	N.A.	0	19 (9)	N.A.
Amikacina	0	0	N.A.	0	1 (0.4)	N.A.
Ceftriaxone	0	N.D.	N.A.	0	0.1 (0)	N.A.
Acido nalidixico	0	0	N.A.	0	27 (8)	N.A.
Ciprofloxacina	0	N.D.	N.A.	0	16 (5)	N.A.

SXT: trimetoprim/sulfametossazolo;

N.D.: non determinato;

N.A.: non applicabile;

N.S.: non significativo (P> 0,05).

Geni di resistenza acquisiti in ceppi antibiotico-resistenti di *Escherichia coli* isolati in Perù (Angaiza; n = 111) e in Bolivia (Alto Los Zarzos; n=113)

Geni ricercati per ogni antibiotico-resistenza o classe di integrone	N° ceppi positivi / n° ceppi testati (%) (95% CI)	
	Angaiza	Alto Los Zarzos
Ampicillina		
<i>bla</i> _{TEM}	62/64 (97%; 89–100%)	80/81 (99%; 93–100%)
Tetracicline		
<i>tet</i> (A)	50/100 (50%; 40–60%)	52/103 (50%; 40–60%)
<i>tet</i> (B)	50/100 (50%; 40–60%)	51/103 (50%; 39–59%)
Trimetoprim/sulfametossazolo		
<i>dfrA8</i>	38/69 (55%; 43–67%)	50/71 (70%; 58–81%)
<i>sul1</i>	22/69 (32%; 21–44%)	14/71 (20%; 11–31%)
<i>sul2</i>	48/69 (70%; 57–80%)	69/71 (97%; 90–100%)
Cloramfenicolo		
<i>catI</i>	45/46 (98%; 88–100%)	46/48 (96%; 86–99%)
Class 1 integrone		
<i>intI1</i>	44/111 (40%; 30–49%)	14/113 (12%; 7–20%)

Geni di resistenza acquisiti in ceppi di *Escherichia coli* multi-resistenti (resistenti a tetraciclina, ampicillina e trimetoprim/sulfametossazolo) isolati nella comunità remota di Angaiza e in quattro aree urbane dell'America Latina (Yurimaguas e Moyobamba, Peru; Camiri e Villa Montes, Bolivia)

Tratto di resistenza o tipo di integrone	Gene	N° ceppi positivi / n° ceppi testati (%) (95% CI)	
		Angaiza (n =43)	Area urbana (n =45)
Ampicillina	<i>blaTEM</i>	43 (100%; 92–100%)	45 (100%; 92–100%)
Tetracicline	<i>tet(A)</i>	25 (58%; 43–73%)	21 (47%; 31–62%)
	<i>tet(B)</i>	18 (42%; 27–58%)	23 (51%; 36–66%)
	<i>tet(D)</i>	0 (0%; 0–8%)	1 (2%; 0–12%)
SXT	<i>dfrA8</i>	28 (65%; 49–79%)	29 (64%; 49–78%)
	<i>sul1</i>	11 (26%; 13–41%)	11 (24%; 13–39%)
	<i>sul2</i>	33 (77%; 61–88%)	42 (93%; 82–99%)
Class 1 integrone	<i>intI1</i>	5 (12%; 4–25%)	13 (29%; 16–44%)

Conclusioni

- ❑ Questo studio sugli abitanti di «Angaiza» ha evidenziato in *E. coli* elevati livelli di resistenza acquisita agli antibiotici più vecchi (tetraciclina, ampicillina, SXT, streptomicina e cloramfenicolo).
- ❑ E' stata rilevata, inoltre, una notevole differenza nell'incidenza della resistenza ai chinoloni: assente nella comunità isolata ed elevata in ambiente urbano.
Ciò potrebbe suggerire due ipotesi:
 - ❑ La diffusione e il mantenimento della resistenza ai chinoloni, principalmente correlata a meccanismi mutazionali, potrebbe essere maggiormente influenzata da un'esposizione continua ai farmaci rispetto a resistenze ad altre classi di antibiotici;
 - ❑ Nella comunità remota il flusso di antibiotico-resistenze dall'esterno potrebbe essere in funzione del tempo e limitato alle resistenze che mostrano tassi più elevati nell'ambiente esposto agli antibiotici.

Ceppi umani commensali di *Escherichia coli*, isolati da una comunità molto isolata dell'Amazzonia peruviana con minima esposizione agli antibiotici, hanno mostrato elevati livelli di resistenza ai più vecchi farmaci quali ampicillina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametossazolo, streptomina e cloramfenicolo. Gli isolati, appartenenti a differenti cloni, possedevano una varietà di geni e plasmidi di antibiotico-resistenza. La situazione osservata, era complessivamente sovrapponibile a quella evidenziata in un precedente studio condotto su un'altra comunità, sempre remota, della Bolivia. Va sottolineato che, a parte una minore incidenza di ceppi antibiotico-resistenti e la totale assenza di resistenza ai chinoloni, gli isolati provenienti dalla comunità remota mostravano caratteristiche molto simili a quelle dei ceppi isolati da una area urbana vicina. I risultati ottenuti da questo studio suggeriscono che la resistenza agli antibiotici osservabile in comunità remote con minima esposizione agli antibiotici sia un fenomeno generale regolato da complessi meccanismi.