



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata**

*Analisi della resistenza antimicrobica in ceppi di Brucella
isolati sul territorio italiano*

*Analysis of antimicrobial resistance in Brucella strains
isolated in Italy*

Tesi di Laurea Magistrale di:

Martina Cicconi

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Elena Rocchegiani

Correlatore:

Dott. Giuliano Garofolo

Sessione estiva Luglio 2022

Anno accademico 2021/2022

*A mia madre e mio padre,
esempi di vita e fonti inesauribili di amore.*

*A mio fratello,
parte del mio cuore.*

A me stessa, ai miei progetti futuri.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Brucellosi animale</i>	2
1.1.1 <i>Epidemiologia</i>	2
1.1.2 <i>Manifestazioni cliniche</i>	3
1.2 <i>Brucellosi umana</i>	4
1.2.1 <i>Quadro clinico ed epidemiologico</i>	4
1.2.2 <i>Rischio occupazionale</i>	6
1.3 <i>Il ruolo dei prodotti lattiero-caseari nella trasmissione dell'infezione da Brucella spp.</i>	7
1.4 <i>Distribuzione globale della brucellosi umana</i>	11
1.5 <i>La zoonosi sul territorio italiano: il divario Nord-Sud</i>	17
1.6 <i>Trattamento della brucellosi nell'uomo</i>	25
2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA	28
2.1 <i>Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza</i>	28
2.1.1 <i>Origine della resistenza agli antimicrobici</i>	29
2.1.2 <i>Trasferimento orizzontale dei geni di resistenza</i>	31
2.1.3 <i>Meccanismi di resistenza agli antibiotici</i>	35
2.2 <i>Uso degli antimicrobici nell'uomo e negli animali</i>	40
2.3 <i>Rischio per la salute umana associato al consumo di antimicrobici negli animali</i> .	45
2.4 <i>Antibiotico-resistenza: la strategia One Health</i>	48
2.5 <i>Resistenza antimicrobica nel genere batterico Brucella spp.</i>	51
3. PARTE SPERIMENTALE.....	54
3.1 <i>Scopo del lavoro</i>	54
4. MATERIALI E METODI	56
4.1 <i>Campioni</i>	56
4.2 <i>Test di suscettibilità agli antibiotici</i>	58
4.2.1 <i>Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)</i>	58
4.2.2 <i>Interpretazione dei risultati</i>	64
5. RISULTATI	70
5.1 <i>Analisi dei ceppi isolati</i>	70
5.2 <i>Suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi testati</i>	73

5.3 Parametri test di microdiluizione in brodo	85
5.4 Determinazione dei tassi di prevalenza delle resistenze antimicrobiche	86
6. DISCUSSIONE	88
BIBLIOGRAFIA	98

1. INTRODUZIONE

La brucellosi, nota anche come “febbre ondulante” o “febbre di Malta” o “febbre mediterranea”, viene annoverata tra le malattie zoonotiche più diffuse a livello mondiale. Principalmente conosciuta come una malattia degli animali, in particolare del bestiame domestico, si trasmette frequentemente all’uomo che costituisce l’ospite accidentale.

L’infezione è sostenuta da batteri appartenenti a diverse specie del genere *Brucella*. All’interno del genere si distinguono sei specie principali che presentano una caratteristica specificità d’ospite: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis*.

Nell’ultimo decennio sono stati isolati ceppi di *Brucella* da mammiferi marini, classificati in due nuove specie: *B. ceti* e *B. pinnipedialis*. Una nuova specie, denominata *B. microti*, è stata isolata dall’arvicola comune.

Infine sono stati descritti isolati da protesi mammarie umane e infezioni polmonari e da babbuini, formalmente pubblicati come la decima e l’undicesima specie di *Brucella*, rispettivamente *B. inopinata* e *B. papionis* (OIE, 2018).

L’agente eziologico della brucellosi fu identificato per la prima volta nel 1887 da Sir David Bruce: il microrganismo venne isolato da un soldato britannico deceduto a causa della febbre maltese. Inizialmente noto come *Micrococcus*

melitensis, fu rinominato *Brucella melitensis* in suo onore. Da allora *Brucella spp.* è sempre stato di interesse zoonotico nel corso della storia (Godfroid *et al.*, 2005).

Ad oggi la brucellosi, pur mostrando una diffusione globale con tassi di incidenza ampiamente variabili per i diversi paesi, è considerata una zoonosi trascurata a causa delle limitate risorse dedicate alla sua sorveglianza e controllo; tale situazione risulta essere particolarmente accentuata nei paesi in via di sviluppo economico (Janowicz *et al.*, 2020).

1.1 Brucellosi animale

1.1.1 Epidemiologia

La brucellosi è una malattia che colpisce molte specie animali, selvatiche e domestiche, e molte di queste sono allevate per la produzione di alimenti (pecore da latte, capre, bovini e suini).

Le diverse specie di *Brucella* presentano preferenza d'ospite, tuttavia non sono da escludere infezioni tra specie diverse.

Nei bovini l'infezione da *Brucella spp.* è causata principalmente da *B. abortus*; in alcuni paesi in cui i bovini sono tenuti in stretta associazione con pecore o capre, l'infezione può essere sostenuta da *B. melitensis*. Meno frequentemente vengono riscontrate infezioni da *B. suis*.

Negli ovini e nei caprini la brucellosi riconosce come principale agente eziologico *B. melitensis*. Altra specie infettante gli ovini viene identificata in *B. ovis* che risulta tuttavia avere un minore impatto in relazione ai casi di malattia umana (Corbel, 2006).

Nei suini l'infezione è sostenuta da *B. suis*. Nei focolai d'Europa i cinghiali sono considerati il principale serbatoio selvatico di questa specie e fonte di infezione per i suini allevati all'aperto (OIE, 2018).

Nei cani è causata invece da *B. canis*; l'escrezione urinaria può rappresentare un pericolo per l'uomo ma la malattia umana causata da questa specie si verifica di rado (Seleem *et al.*, 2010).

1.1.2 Manifestazioni cliniche

L'infezione da *Brucella spp.* negli ospiti animali interessa il sistema riproduttivo e si manifesta negli animali sessualmente maturi - femmine gravide - con segni e sintomi caratteristici quali aborto, parto prematuro, ritenzione della placenta (OIE, 2018).

Inoltre, nell'80% degli animali infetti si osserva una localizzazione delle brucelle a livello delle ghiandole mammarie e dei linfonodi sopramammari con conseguente escrezione dei microrganismi nel latte (Seleem *et al.*, 2010).

I maschi adulti possono invece sviluppare orchiti ed epididimiti.

La malattia può decorrere in maniera asintomatica negli animali giovani e nelle femmine non gravide (OIE, 2018).

La brucellosi animale è altamente contagiosa a causa dello stretto contatto dei capi di bestiame nei greggi o nelle mandrie, la commistione con quelli di diversi proprietari, il contatto tra animali domestici e selvatici.

La trasmissione può avvenire attraverso ambienti contaminati da secrezioni derivanti da tessuti abortiti o ingestione di mangime contaminato.

La diagnosi di brucellosi animale deve essere supportata da test di laboratorio mirati a verificare la presenza del microrganismo nei campioni raccolti - tessuti, latte, tampone vaginale, secrezioni, feti abortiti - mediante metodi molecolari e batteriologici o a dimostrare una risposta anticorpale nei confronti di *Brucella spp.* facendo ricorso a metodi sierologici (Corbel, 2006).

1.2 Brucellosi umana

1.2.1 Quadro clinico ed epidemiologico

L'infezione da *Brucella spp.* si manifesta nell'uomo come una malattia febbrile acuta o subacuta caratterizzata da febbre associata a malessere, anoressia, prostrazione.

Nei pazienti con diagnosi errate e non trattati, la malattia evolve in forma cronica e possono insorgere complicazioni a carico dell'apparato muscolo-

scheletrico, cardiovascolare e nervoso centrale (endocarditi, osteomieliti, neurobrucellosi).

Per quanto concerne il meccanismo patogenetico, i batteri appartenenti al genere *Brucella* sono patogeni intracellulari facoltativi che sopravvivono e si moltiplicano all'interno delle cellule fagocitiche dell'ospite quali monociti e macrofagi del sistema reticoloendoteliale (SRE), localizzati nei linfonodi, fegato, milza, midollo osseo.

La *Brucella melitensis* è la specie più frequentemente isolata dai casi di brucellosi umana. *B. abortus* può rendersi altresì responsabile di malattia nell'uomo, che tuttavia si manifesta in forma meno grave.

B. suis è sporadicamente associata a brucellosi umana e la patogenicità di questa specie è correlata al biovar: i biovar 1 e 3 risultano avere una virulenza maggiore e sono associati a malattia severa.

L'infezione è acquisita principalmente per via respiratoria, congiuntivale o cutanea attraverso soluzioni di continuo della cute ed inoltre, per via alimentare, a seguito dell'ingestione di latte infetto non pastorizzato e prodotti lattiero-caseari contaminati (OIE, 2018).

La trasmissione uomo-uomo risulta estremamente rara.

La diagnosi di brucellosi umana, analogamente alla brucellosi animale, si basa su metodi molecolari e batteriologici, oltre ad approcci immunologici. La storia clinica del paziente (professione, viaggi in paesi in cui la malattia è diffusa in maniera endemica, cibo ingerito) risulta in tale circostanza di estrema utilità per evitare diagnosi ritardate o errate (Seleem *et al.*, 2010).

1.2.2 Rischio occupazionale

Alcune categorie di lavoratori sono esposte ad un rischio maggiore di infezione per via del contatto diretto con animali infetti o attraverso l'esposizione ad un ambiente fortemente contaminato.

Le figure professionali in questione sono allevatori, veterinari, macellai, tosatori, trasformatori di pelli e lana, personale addetto alla manipolazione dei prodotti animali nell'industria alimentare, manutentori di stalle ed aziende agricole.

Pecore, capre e bovini infettati da *B. melitensis* o *B. abortus* e suini infettati da *B. suis* sono particolarmente pericolosi nelle fasi di macellazione. Per tutelare la salute dei lavoratori è fortemente raccomandato l'utilizzo di indumenti protettivi adeguati oltre che un rigoroso rispetto delle misure igieniche (Corbel, 2006).

Il personale di laboratorio è particolarmente a rischio: la manipolazione di materiale potenzialmente infetto/contaminato deve essere eseguita ad un livello di biosicurezza e contenimento appropriato, ovvero all'interno dei laboratori *BSL-3*.

La produzione e l'uso di vaccini è altresì considerata un'attività pericolosa per via dell'utilizzo di ceppi vivi attenuati come *B. abortus* S19 e *B. melitensis* REV1 (OIE,2018).

1.3 Il ruolo dei prodotti lattiero-caseari nella trasmissione dell'infezione da *Brucella spp.*

La trasmissione alimentare rappresenta la più comune fonte di infezione per la popolazione generale che non ha un contatto diretto con gli animali.

L'ingestione di latte fresco non pastorizzato e latticini da esso derivati è fortemente sconsigliata nelle aree endemiche per la brucellosi; tali alimenti fungono da principali veicoli per il trasferimento di *Brucella spp.* dagli animali all'uomo.

Il latte proveniente da animali infetti come bovini, bufali, pecore e capre, può contenere un elevato numero di microrganismi che possono concentrarsi durante la preparazione di derivati come formaggio. In particolar modo, i formaggi a pasta molle sono da considerarsi particolarmente a rischio a

differenza dei formaggi a pasta dura in cui le fermentazioni lattica e propionica contribuiscono a creare nell'alimento condizioni sfavorevoli per la sopravvivenza e la moltiplicazione dei batteri del genere *Brucella*.

In relazione alla persistenza del microrganismo negli alimenti, è noto che condizioni di acidità relative a valori di pH 3.5-4, ne riducono la proliferazione garantendone l'eliminazione. Conseguentemente a quanto affermato, derivati come yogurt, panna e latte acido presentano un rischio inferiore di contaminazione.

Efficace strategia di controllo degli alimenti è rappresentata dalla pastorizzazione del latte destinato al consumo umano. In assenza di impianti di pastorizzazione, l'eliminazione delle brucelle può essere ottenuta mediante trattamenti termici adeguati (temperatura minima di 80-85°C per alcuni minuti).

La carne, a differenza dei prodotti lattiero-caseari, è meno frequentemente associata a casi di trasmissione alimentare di brucellosi: i microrganismi, in funzione dell'elevato tropismo per le cellule del SRE, si concentrano principalmente in organi come milza, fegato, reni invece che nel tessuto muscolare che presenta concentrazioni batteriche inferiori. Una cottura adeguata prima del consumo elimina il rischio di trasmissione dell'infezione alimentare (Corbel, 2006).

Relativamente ai casi di brucellosi umana associati al consumo di latticini, alcuni studi hanno evidenziato che fattori come la patogenicità del ceppo, la quantità di *Brucella* ingerita e le condizioni di salute del consumatore, influenzano lo sviluppo della malattia a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati.

La sopravvivenza e la crescita di *Brucella spp.* nei prodotti lattiero-caseari sono fortemente influenzate dai metodi di produzione e dalle condizioni di conservazione.

Fattori intrinseci ed estrinseci sono correlati con la proliferazione del microorganismo negli alimenti: concentrazione di NaCl, pH, temperatura, tempo di conservazione, attività dell'acqua, presenza del microbiota in competizione. Elevate concentrazioni di NaCl utilizzate per la salatura compromettono la crescita delle brucelle diminuendo l'attività dell'acqua; al contrario metodi di conservazione basati sulla refrigerazione e sul congelamento non inducono l'eliminazione dei microrganismi.

I batteri fermentanti limitano la proliferazione del patogeno creando condizioni di acidità. A tal proposito è stato osservato che ceppi di *B. abortus* sembrano mostrare una maggiore tolleranza al pH riuscendo a sopravvivere per diversi giorni nel latte ad un pH inferiore a 4, contrariamente a ceppi appartenenti alla specie *B. melitensis*.

Sebbene la pastorizzazione garantisca l'eliminazione dei ceppi di *Brucella*, l'elevato consumo di prodotti lattiero-caseari ottenuti da latte crudo, è ancora responsabile di numerosi casi di brucellosi umana.

Lo sviluppo di politiche atte a prevenire il commercio illegale di latte crudo, associate a misure di controllo da attuare all'interno degli allevamenti e in tutte le attività delle filiera di produzione alimentare di origine animale, potrebbero avere un ruolo decisivo nel ridurre la diffusione di questa zoonosi.

In materia di igiene e sicurezza degli alimenti, i metodi diagnostici utilizzati per l'identificazione di *Brucella* nel latte e derivati sono riconducibili a metodi molecolari (PCR, qPCR) e metodi microbiologici.

L'isolamento batterico è considerato il *gold standard* per la ricerca del patogeno; tale metodica non è tuttavia esente da limitazioni legate alla necessità di avere batteri vitali nel campione, tempi lunghi di crescita, oltre a problemi inerenti la sicurezza dell'operatore.

Gli approcci molecolari permettono di superare queste problematiche garantendo sensibilità, specificità, rapidità nella risposta (Dadar *et al.*, 2019).

Malgrado l'infezione sia raramente fatale, rimane un grave problema di salute pubblica (Janowicz *et al.*, 2020).

Con le attuali norme inerenti la lavorazione termica del latte, il rischio di infezione da *Brucella* è notevolmente diminuito nei paesi più sviluppati.

Tuttavia l'incidenza della brucellosi umana rimane elevata nelle piccole comunità di allevatori di bestiame e nei paesi in via di sviluppo dove le norme igieniche e i regolamenti relativi alla preparazione degli alimenti non sono adeguatamente applicati (Dadar *et al.*, 2019).

1.4 Distribuzione globale della brucellosi umana

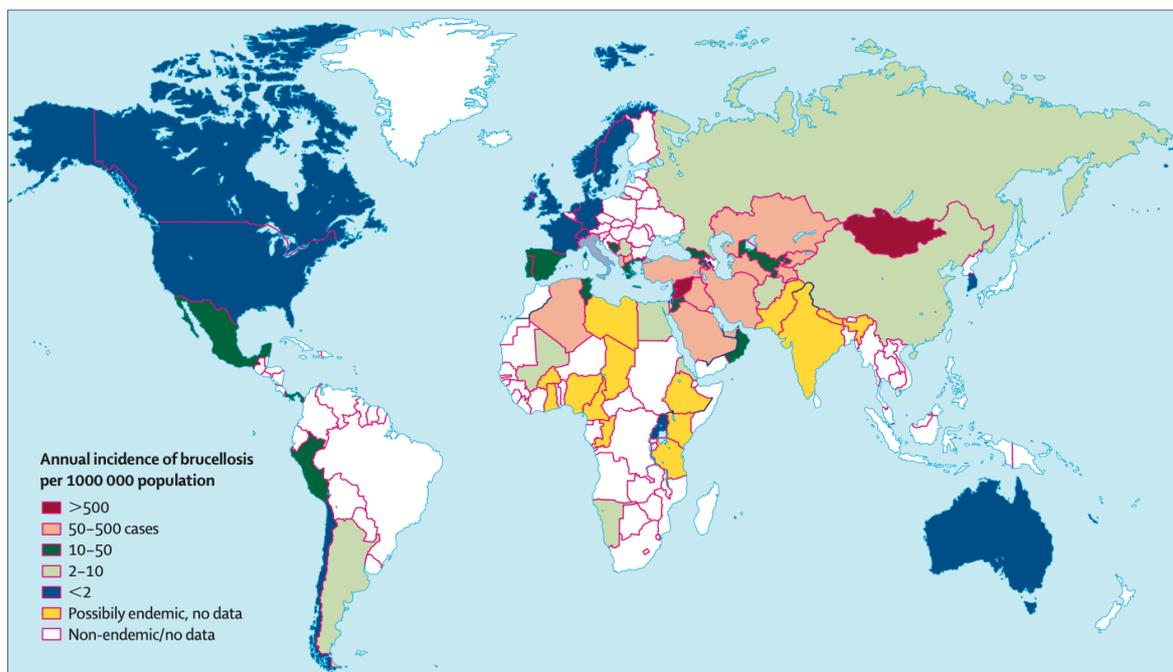


Figura 1. Distribuzione globale della brucellosi umana. Da “The new global map of human brucellosis.” Lancet Infect Dis (2006), Pappas G. et al.

L'epidemiologia della brucellosi umana è cambiata drasticamente negli ultimi decenni: diverse aree tradizionalmente considerate endemiche hanno ottenuto il controllo della malattia. Tra queste annoveriamo la Francia, Israele e la maggior parte dell'America Latina.

In altre zone sono emersi nuovi focolai, in particolare in Asia centrale, mentre la situazione è in peggioramento nei paesi del Medio Oriente (*Figura 1*).

Inoltre, la malattia è ancora presente, con andamento variabile, nei paesi Europei e negli USA (Pappas *et al.*, 2006).

Analizzando l'incidenza e la distribuzione della brucellosi nelle Americhe, è necessario focalizzare l'attenzione sullo stato del Messico che rimane uno dei più importanti serbatoi di brucellosi umana. L'endemicità della zoonosi nei distretti settentrionali dello stato messicano si riflette sull'epidemiologia della malattia negli Stati Uniti d'America: il maggior numero di casi viene riscontrato negli stati centro-meridionali occidentali - California, Arizona, New Mexico, Texas - e in alcuni stati settentrionali come il Wyoming. La malattia sarebbe importata attraverso il confine tra Stati Uniti e Messico per mezzo di latticini infetti, in particolare i formaggi a pasta molle messicani.

E' evidente che programmi di controllo nazionali non sono sufficienti in tale contesto al raggiungimento dell'eradicazione della brucellosi: l'attuazione di strategie internazionali potrebbe rappresentare una valida soluzione al problema.

Altra situazione di rilievo nel continente americano è rappresentata dal Sud America (Perù, Cile, Argentina), tradizionalmente considerata un'area endemica per la brucellosi umana (Pappas *et al.*, 2006).

Il panorama europeo in materia di brucellosi umana risulta molto variegato: si riconoscono stati che hanno acquisito lo status di indenne da brucellosi (OBF= Officially brucellosis free) accanto a paesi in cui, pur osservando un calo costante o graduale dei casi annuali, il tasso di incidenza risulta tutt'oggi elevato (non-OBF).

Le aree attualmente considerate ad alta prevalenza di brucellosi in Europa sono ascrivibili al bacino del Mediterraneo (Pappas *et al.*, 2006).

La correlazione tra i focolai di brucellosi animale e umana è evidente: secondo il rapporto annuale sulle zoonosi e sugli agenti zoonotici pubblicato nel Dicembre 2021 e curato dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), la brucellosi bovina e ovo-caprina è ancora prevalente in Grecia e in alcune regioni dell'Italia e del Portogallo.

I tre Stati membri dell'UE citati presentano il più alto numero di casi di brucellosi acquisita dall'uomo in casa - ovvero non correlata a viaggi in aree endemiche - e la più alta prevalenza di allevamenti *Brucella*-positivi (EFSA, 2021).

I casi di brucellosi umana possono rivelarsi un utile indicatore della presenza della malattia nelle popolazioni animali (Corbel, 2006).

Facendo riferimento al prodotto interno lordo (PIL) dei paesi europei, è stata messa in relazione l'endemicità della brucellosi con lo stato socioeconomico delle regioni più colpite: dall'analisi effettuata è emerso che le aree del Portogallo e della Grecia in cui la brucellosi è ancora endemica sono anche le aree più povere dell'UE (Pappas *et al.*, 2006).

In relazione alle specie di *Brucella* responsabili di infezioni umane in UE, *B. melitensis* viene segnalato come agente eziologico nella maggioranza dei casi mentre *B. abortus* e *B. suis* sono state isolate in casi sporadici.

E' stata tuttavia osservata una chiara stagionalità nei casi di brucellosi: la maggior parte delle segnalazioni è attribuita al periodo tra Aprile e Agosto.

Con riferimento alle fasce d'età, un elevato numero di pazienti appartiene alla fascia 25-64 anni, un minor numero di casi si è registrato in adulti >64 anni e ancora inferiore è stato il numero di pazienti di età <25 anni.

In generale nell'ultimo quinquennio (2016-2020) si è registrata una tendenza al calo significativa dei casi confermati di brucellosi umana.

Non è da escludere che tale andamento potrebbe essere l'effetto della pandemia da COVID-19 che ha ridotto i viaggi internazionali e limitato le risorse stanziare nel sistema sanitario per l'individuazione di malattie diverse dal COVID, unitamente al declino della brucellosi animale, ottenuto grazie ai programmi di sorveglianza e controllo messi in atto (EFSA, 2021).

In Medio Oriente la brucellosi risulta essere ancora fortemente endemica:

l'incidenza di questa zoonosi appare incontrollata in molti paesi nonostante i continui tentativi di controllo sia della malattia umana che animale.

Le realtà di guerra, conflitti e carestie che paesi come Iraq, Iran, Siria, Libano, si trovano affrontare da anni, sono da riconoscere tra le principali cause di insuccesso dei programmi di eradicazione della brucellosi.

Per altri stati come le repubbliche dell'ex Unione Sovietica, gli elevati tassi di incidenza della brucellosi sono riconducibili all'instabilità economica e finanziaria che non permette alle istituzioni nazionali di investire su piani di intervento; d'altro canto poichè una percentuale sostanziale di queste popolazioni fa affidamento sul bestiame per la propria sopravvivenza, la malattia influisce ulteriormente sulla precarietà economica degli stessi territori.

Per quanto riguarda la Cina e la Corea del Sud, è stato osservato un numero crescente di casi umani di brucellosi negli ultimi anni.

Infine, per il Nord Africa e l'Africa subsahariana, i dati sulla prevalenza della malattia rimangono sconosciuti. La maggior parte dei paesi africani presenta uno status socioeconomico povero, con persone che vivono a diretto contatto con il bestiame e le reti sanitarie sono inesistenti.

Oltretutto, il territorio è interessato da malattie infettive di primaria importanza, tra cui la malaria: la maggior parte dei pazienti febbrili in questi paesi viene diagnosticata empiricamente come affetta da malaria e non viene testata per la brucellosi, mancando di strutture sanitarie attrezzate per l'esecuzione di test di laboratorio necessari (Pappas *et al.*, 2006).

1.5 La zoonosi sul territorio italiano: il divario Nord-Sud

BRUCELLOSI BOVINA
Province e Regioni ufficialmente indenni ai sensi della normativa comunitaria 385 del 2 marzo 2021

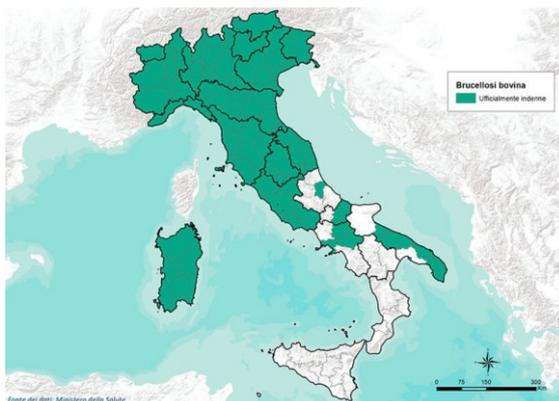


Figura 2. Province e Regioni ufficialmente indenni da Brucellosi bovina ai sensi della normative comunitaria 385 del 2 marzo 2021.

BRUCELLOSI OVI-CAPRINA
Province e Regioni ufficialmente indenni ai sensi della normativa comunitaria 385 del 2 marzo 2021



Figura 3. Province e Regioni ufficialmente indenni da Brucellosi ovi-caprina ai sensi della normative comunitaria 385 del 2 marzo 2021.

Fonte: Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale".

In Italia, la brucellosi è una malattia a notifica obbligatoria dal 1934 e ha raggiunto la sua massima incidenza nell'uomo nel secondo dopoguerra, con 20 casi notificati ogni 100.000 abitanti.

A partire dagli anni '50, a seguito dell'adozione di piani di profilassi e controllo nazionali e regionali, è stata osservata una diminuzione nel numero di casi segnalati l'anno di brucellosi umana e animale (Facciola *et al.*, 2018).

Attualmente l'Italia viene annoverata tra i paesi non ufficialmente indenni da brucellosi; tuttavia, ai sensi della Decisione di esecuzione (UE) 2021/385 della Commissione, del 2 Marzo 2021, sono riconosciute come indenni da brucellosi bovina 12 regioni e 10 province (Figura 2) e, come indenni da brucellosi ovi-caprina, 14 regioni e 9 province (Figura 3).

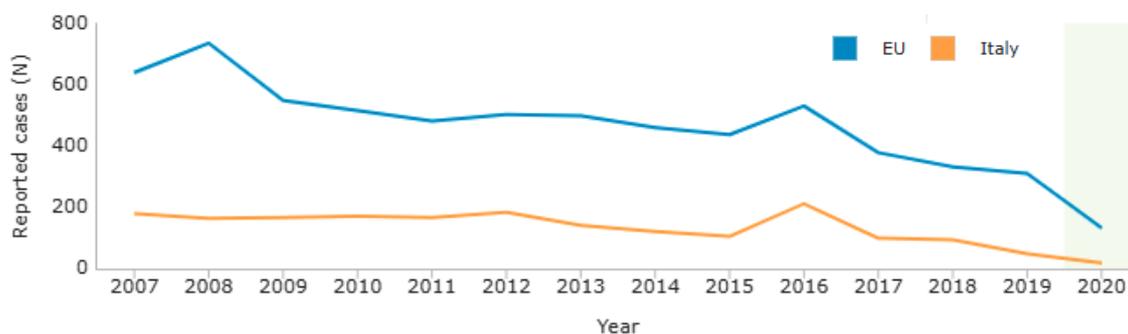


Figura 4. Numero di casi riportati l'anno di brucellosi umana in Italia e in Europa. Da "Surveillance Atlas of Infectious Diseases" ECDC.

I dati raccolti dall'EFSA negli ultimi anni provenienti dai programmi di monitoraggio ed eradicazione attuati dai paesi europei, permettono di analizzare il trend epidemiologico della brucellosi umana in Italia e confrontarlo con l'andamento generale della zoonosi in Europa.

Il grafico evidenzia la tendenza al calo relativa al numero di casi riportati annualmente, in linea con l'andamento europeo e particolarmente accentuata negli ultimi 5 anni (2016-2020) (Figura 4).

Il picco mostrato relativo all'anno 2016 è riconducibile ad un focolaio importante sviluppatosi nella provincia di Messina, in Sicilia, con 137 casi notificati, legato al consumo di formaggio fresco locale, noto come “tuma” (Facciola *et al.*, 2018).

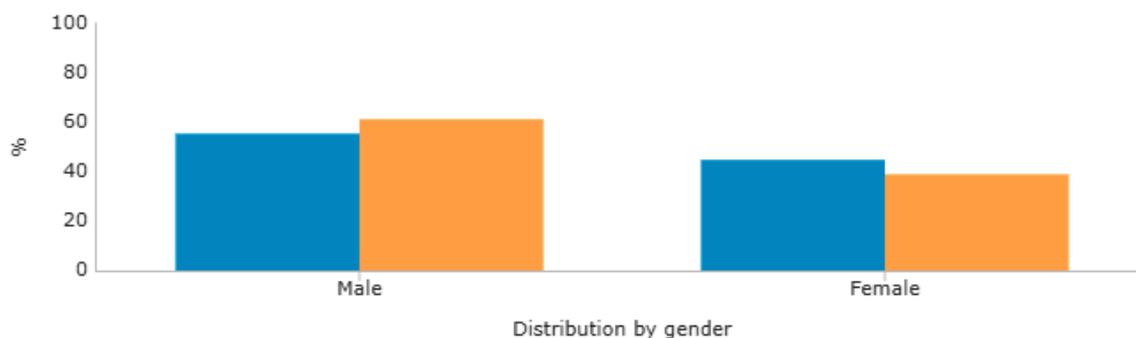


Figura 5. Distribuzione per genere dei pazienti affetti da brucellosi umana nel 2020. Da “Surveillance Atlas of Infectious Diseases” ECDC.

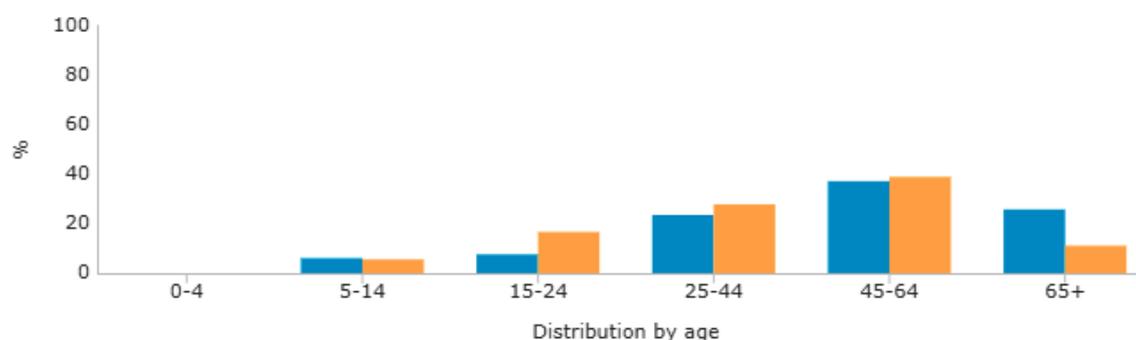


Figura 6. Distribuzione in fasce d'età dei pazienti affetti da brucellosi umana nel 2020. Da “Surveillance Atlas of Infectious Diseases” ECDC.

Facendo riferimento ai casi clinici segnalati nell'anno 2020, il 61.1% dei pazienti era di sesso maschile e il 38.9% di sesso femminile (Figura 5); il maggior numero di pazienti si registra nella fascia d'età 25-64 anni (Figura 6).

L'identificazione dei ceppi isolati in focolai di brucellosi animale e umana è uno strumento essenziale per comprendere pienamente l'epidemiologia della malattia e risalire alle fonti di infezione.

Un'analisi condotta dal Centro di Referenza Nazionale per le Brucellosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" nel periodo 2007-2015 ha portato all'individuazione dei principali ceppi circolanti sul territorio italiano e alla determinazione della relativa distribuzione nelle aree più colpite.

Dai dati raccolti è emerso che i ceppi di campo isolati da bovini e bufali erano attribuibili ai biovar 1 e 3 della specie *B. abortus*; meno frequentemente i microrganismi isolati appartenevano alla specie *B. melitensis*. La maggior parte dei ceppi di *B. abortus* biovar 1 è stata isolata in Campania, dove peraltro si concentra l'allevamento dei bufali; in Basilicata, nella provincia di Potenza, al confine con la Campania; in Calabria si denota un'intensa distribuzione dei ceppi in questione nelle province di Cosenza, Crotona, Catanzaro e Reggio Calabria; in Sicilia, i ceppi sono presenti con maggiore incidenza nella parte orientale dell'isola; infine in Puglia la zona più interessata risulta essere l'area del Gargano.

Il ceppo più isolato dai focolai di brucellosi ovi-caprina viene invece identificato in *B. melitensis* biovar 3 e risulta distribuito in tutto il Sud- Italia: dal basso Lazio alla Campania, Basilicata, Puglia con maggiore presenza nella zona del Gargano ed infine si rileva con un'elevata incidenza nelle regioni di Calabria e in Sicilia.

Il principale ceppo responsabile di brucellosi nei cinghiali in Italia e in generale in Europa, risulta essere *B. suis* biovar 2. L'agente patogeno viene trasmesso sporadicamente ai suini domestici che costituiscono una potenziale fonte di infezione umana (De Massis *et al.*, 2019).

Ulteriori analisi, basate su approcci WGS e SNP-assay, hanno permesso di ricostruire la storia evolutiva di *B. abortus* e *B. melitensis* in Italia.

Dagli studi è emerso che gli isolati italiani di *B. abortus* si diversificano da quelli presenti nel resto dell'Europa e risultano più strettamente correlati ai ceppi circolati nel Medio Oriente e in Asia. Tale diversità può essere spiegata da eventi di mescolamento di capi di bestiame di origine diversa, verificatisi in passato, quando ancora non erano presenti sul territorio italiano programmi di sorveglianza e controllo (Garofolo *et al.*, 2017).

In Italia la brucellosi bovina e ovi-caprina rimane un importante problema economico e sanitario, soprattutto nelle regioni meridionali quali Campania, Puglia, Calabria e Sicilia.

La Sicilia appare la regione più colpita: per quanto riguarda l'allevamento ovi-caprino che rappresenta una delle principali risorse per l'economia regionale, si registrano ancora numerosi casi, mentre si osserva una lieve riduzione del numero di allevamenti bovini infetti.

La persistenza della brucellosi può essere messa in relazione con il tipo di produzione: nella realtà siciliana per le mandrie da latte viene solitamente utilizzato un allevamento intensivo; al contrario nelle stesse aree geografiche le mandrie da carne sono allevate estensivamente. L'abitudine degli allevatori di spostare gli animali verso i pascoli estivi, con possibilità di contatto tra capi di bestiame appartenenti a mandrie diverse, può rappresentare un fattore di rischio per la diffusione della zoonosi sul territorio (Calistri *et al.*, 2013).

Per far fronte al problema della brucellosi ovi-caprina e bovina, il governo italiano ha adottato nel corso degli anni strategie diverse.

Fino al 1992 il controllo della brucellosi bovina si basava sulla vaccinazione degli animali giovani con il ceppo vaccinale *B. abortus* S19 (Calistri *et al.*, 2013).

L'efficacia del vaccino variava a seconda di parametri quali l'età della vaccinazione, la dose, la via di somministrazione e la prevalenza della brucellosi negli allevamenti vaccinati. Inoltre, sebbene il ceppo 19 fosse di bassa virulenza per i bovini, la vaccinazione delle vacche gravide era in grado di provocare aborti (Schurig *et al.*, 2002).

L'impiego del ceppo vaccinale S19 mostrava tuttavia come inconveniente la produzione di anticorpi capaci di interferire con i test sierologici utilizzati per la diagnosi di brucellosi (Caporale *et al.*, 2010). Questo problema è stato superato con lo sviluppo del ceppo mutante *B. abortus* RB51 resistente alla rifampicina (Schurig *et al.*, 2002).

Al contempo il controllo della brucellosi ovina e caprina era attuato attraverso la vaccinazione del bestiame con il ceppo vivo e attenuato di *B. melitensis* REV1. Lo stesso ceppo vaccinale provocava spesso l'aborto e l'escrezione nel latte se somministrato ad animali durante la gravidanza (Schurig *et al.*, 2002).

Con i decreti ministeriali D.M. 453/1992 e 651/1994 l'Italia ha adottato una strategia di eradicazione basata su una rigorosa politica di test sierologici e macellazione dei capi di bestiame infetti ed ha vietato la vaccinazione degli animali per brucellosi.

A seguito dell'applicazione di tali disposizioni, è stata osservata una lenta ma costante diminuzione della prevalenza della malattia: secondo i dati pubblicati

dall'EFSA nel EU One Health Zoonoses Report 2020, i tassi di prevalenza della brucellosi bovina ed ovi-caprina in Italia si attestano al di sotto del 2% (EFSA, 2021).

Purtroppo, nonostante le misure di sorveglianza e controllo introdotte, la malattia rimane ancora endemica in diverse province meridionali d'Italia (Janowicz *et al.*, 2020).

Attualmente, in ambito veterinario, la strategia vaccinale non viene perseguita: se da un lato risulterebbe efficace per il controllo e il contenimento della zoonosi, dall'altro comprometterebbe il programma di eradicazione. Il trattamento antibiotico degli animali infetti o potenzialmente esposti non è comunemente utilizzato.

L'abbattimento dei capi sierologicamente positivi risulta pertanto l'unica procedura attuata, pur comportando ingenti perdite economiche per gli allevatori (Corbel, 2006).

1.6 Trattamento della brucellosi nell'uomo

Per quanto concerne la salute umana, in assenza di vaccini sicuri ed efficaci, la prevenzione della malattia nell'uomo si basa esclusivamente su un'adeguata conoscenza delle situazioni di rischio e sul rispetto delle buone norme di comportamento alimentare. In campo clinico, la terapia antibiotica risulta fondamentale per limitare l'infezione.

Il percorso terapeutico definito dall' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 1986 prevede l'uso di doxiciclina per sei settimane, in combinazione con rifampicina per sei settimane o streptomicina per 2-3 settimane.

Tali regimi di trattamento sembrano tuttavia non essere accettati universalmente e soggetti a modifiche soprattutto nelle regioni endemiche (Pappas *et al.*, 2005).

Nel corso degli anni numerosi studi sono stati condotti con l'obiettivo di definire percorsi monoterapici, ridurre la durata del trattamento, individuare nuovi farmaci più efficaci e/o approcci alternativi.

Sin dalle prime analisi è emerso che i regimi terapeutici in monoterapia, analogamente ai trattamenti di breve durata (tre settimane), risultano inadeguati per la cura della brucellosi a causa di una piccola ma significativa percentuale di fallimenti terapeutici, più comunemente sotto forma di ricadute, che si attesta tra il 5% e il 15%.

Antibiotici più recenti come ciprofloxacina e ceftriaxone sono stati testati come farmaci monoterapici con risultati deludenti.

Altri studi hanno visto l'impiego dei fluorochinoloni che, pur se efficaci in alcuni casi clinici, non sono raccomandati come farmaci di prima linea (Ariza *et al.*, 2007).

Le triple combinazioni basate su trimetoprim/sulfametossazolo e rifampicina, di cui si riportano in letteratura opinioni contrastate, rimangono popolari in alcune regioni endemiche per via dei costi significativamente inferiori (Pappas *et al.*, 2005).

Infine alcuni gruppi di ricerca italiani hanno studiato l'uso della minociclina in monoterapia e in combinazione con rifampicina: le prove raccolte sono risultate insufficienti per dimostrare la superiorità del regime terapeutico analizzato rispetto al percorso ufficiale suggerito dalle linee guida dell'OMS (Ariza *et al.*, 2007).

La difficoltà nel trovare regimi terapeutici alternativi è stata correlata da alcuni studiosi alla capacità del microrganismo di penetrare all'interno dei macrofagi formando uno speciale vacuolo acido (*Brucella-containing vacuole, BCV*) che consente al patogeno di sottrarsi all'azione degli antibiotici (Pappas *et al.*, 2005).

L'uso di molecole antibiotiche appartenenti a classi differenti per periodi di tempo prolungati, come raccomandato nella terapia antibrucellotica, crea di fatto le condizioni ideali per l'emergenza delle resistenze antimicrobiche. In relazione ai farmaci attivi contro la *Brucella*, studi recenti evidenziano un aumento nella comunità della resistenza alla rifampicina che comprometterebbe l'efficacia del trattamento di infezioni strettamente correlate come la tubercolosi.

Analogamente altri studi hanno associato l'uso del trimetoprim/sulfametossazolo all'aumento dei tassi di resistenza osservati in *B. melitensis* (Ariza *et al.*, 2007).

Tali osservazioni portano a focalizzare l'attenzione sullo sviluppo di approcci terapeutici alternativi piuttosto che nella scoperta di regimi antimicrobici più efficienti: ad esempio si potrebbe tentare di modificare l'ambiente intracellulare acido in cui risiede il patogeno, consentendo così una maggiore efficacia delle classi di antibiotici comunemente utilizzate (Pappas *et al.*, 2005).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

2.1 Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza

Gli antibiotici hanno rivoluzionato la medicina sotto molti aspetti e hanno permesso di salvare innumerevoli vite umane. L'uso di questi farmaci è stato accompagnato dalla rapida comparsa di ceppi resistenti (Davies *et al.*, 2010).

La resistenza agli antibiotici, o antibiotico-resistenza, è un fenomeno naturale di adattamento di alcuni microrganismi che acquisiscono la capacità di sopravvivere e crescere in presenza di una certa concentrazione di un agente antibatterico (Antibiotico-resistenza nel settore umano, Ministero della Salute, 2009).

La resistenza antimicrobica rappresenta ad oggi un problema globale di sanità pubblica che minaccia la nostra capacità di trattare efficacemente le infezioni batteriche. Microbiologi ed infettivologi hanno da tempo preso atto del problema ma la consapevolezza della minaccia sta raggiungendo solo ora l'opinione pubblica.

Molti agenti infettivi che in passato potevano essere trattati con successo, hanno acquisito resistenza alla maggior parte, e in alcuni casi, a tutte le classi di farmaci antibatterici.

L'uso eccessivo e l'uso inappropriato degli antibiotici in molteplici settori (umano, animale, agricolo) sono da considerarsi tra i fattori principali favorenti lo sviluppo delle resistenze (McEwen *et al.*, 2018).

2.1.1 Origine della resistenza agli antimicrobici

La resistenza agli antibiotici si è sviluppata molto tempo prima dell'introduzione delle sostanze antimicrobiche nella medicina umana e veterinaria.

Studi retrospettivi evidenziano infatti la presenza di geni di resistenza in isolati batterici dell'era pre-antibiotica. Gli studiosi sostengono che tali geni si siano originati milioni di anni fa nei batteri produttori di antibiotici, rappresentando per gli stessi un meccanismo di auto-protezione (Guardabassi *et al.*, 2008).

Si descrivono principalmente tre modalità di sviluppo della resistenza agli agenti antimicrobici da parte delle specie batteriche:

- Acquisizione dei geni di resistenza dai produttori di antimicrobici: in seguito ad integrazione in elementi genetici mobili come plasmidi e trasposoni, tali geni possono essere trasferiti orizzontalmente ad altre specie microbiche, dove possono subire mutazioni che ottimizzano la loro attività funzionale nel nuovo ospite. Ne sono un esempio le proteine di efflusso associate alla

resistenza alla tetraciclina nei batteri Gram-negativi e Gram-positivi (Schwarz *et al.*, 2001).

- Mutazioni spontanee di geni i cui prodotti svolgono un ruolo nel metabolismo batterico: viene alterata la capacità degli enzimi di riconoscere il substrato, generalmente rappresentato da intermedi delle vie biosintetiche o biodegradative, al fine di riconoscere le molecole antibiotiche. Si ritiene che le acetil-, adenil- o fosfotransferasi coinvolte nell'inattivazione degli aminoglicosidi o del cloramfenicolo si siano evolute in questo modo (Schwarz *et al.*, 2001).

- Mutazioni spontanee che modificano le strutture bersaglio degli antibiotici: un esempio può essere identificato nelle topoisomerasi del DNA resistenti agli effetti inibitori dei fluorochinoloni. In alcuni casi è sufficiente una sola mutazione per modificare la struttura bersaglio e determinare la comparsa di ceppi resistenti: si parla in tal caso di mutazioni a singolo stadio. Per altri target sono necessarie più mutazioni per lo sviluppo del fenotipo resistente: il processo viene definito multistadio (Schwarz *et al.*, 2001).

2.1.2 Trasferimento orizzontale dei geni di resistenza

La rapida diffusione dei geni di resistenza antimicrobica tra batteri della stessa specie e di specie e generi differenti è principalmente il risultato di eventi di trasferimento orizzontale di elementi genetici mobili portatori di uno o più geni di resistenza.

Tra questi, plasmidi, trasposoni, integroni/cassette geniche svolgono un ruolo importante. Nello specifico, gli elementi menzionati sono composti da DNA a doppio filamento e differiscono nettamente per dimensioni, strutture, proprietà biologiche e modalità di diffusione (Schwarz *et al.*, 2001).

I **plasmidi** sono elementi extracromosomici capaci di replicazione autonoma. Le proprietà conferite dai plasmidi non sono essenziali per la sopravvivenza della cellula batterica, possono comunque essere di beneficio per il batterio in condizioni specifiche. Queste proprietà accessorie includono la resistenza agli agenti antimicrobici, ai disinfettanti, ai metalli pesanti, alle batteriocine. I plasmidi possono inoltre recare geni codificanti per fattori di virulenza o tossine e geni necessari per le funzioni di fertilità (Schwarz *et al.*, 2001).

A differenza dei plasmidi, i **trasposoni** non possiedono sistemi di replicazione. E' pertanto necessaria l'integrazione in molecole capaci di replicazione come DNA cromosomico o plasmidi per poter esser mantenuti stabilmente.

I trasposoni variano per dimensioni e struttura: i più piccoli, noti come sequenze d'inserzione (IS), contengono esclusivamente il gene della trasposasi mentre quelli più grandi trasportano uno o due geni aggiuntivi (Schwarz *et al.*, 2001).

Le ***cassette geniche*** rappresentano piccoli elementi mobili inferiori ai 2kbp, ad oggi rilevate solo nei batteri Gram-negativi. Questi elementi differiscono dai plasmidi per la mancanza di sistemi di replicazione e dai trasposoni per la mancanza di sistemi di trasposizione. Si muovono dunque per ricombinazione sito-specifica (Schwarz *et al.*, 2001).

Infine gli ***integroni*** sono elementi di DNA frequentemente identificati in ceppi multiresistenti isolati da animali e dall'uomo. Il ruolo degli integroni nello sviluppo della resistenza multipla si basa sulla loro capacità unica di raggruppare ed esprimere i geni di resistenza ai farmaci: in particolare, promuovono la cattura di una o più cassette geniche all'interno dello stesso sito di attacco, formando così gruppi composti di geni di resistenza agli antibiotici (Carattoli, 2001).

I principali meccanismi che facilitano il trasferimento genico orizzontale tra i batteri sono la trasformazione, la trasduzione e la coniugazione (Carattoli, 2001).

La **trasformazione naturale** consiste nell'acquisizione di DNA libero da parte di cellule batteriche competenti. Condizioni necessarie per il processo di trasformazione sono la disponibilità di DNA libero, lo sviluppo della competenza, l'uptake e l'integrazione stabile del DNA internalizzato (Heuer *et al.*, 2007). Si ritiene che la trasformazione svolga solo un ruolo limitato nel trasferimento dei geni di resistenza. Da un lato, il DNA libero proveniente da batteri lisati viene rapidamente degradato nella maggior parte delle condizioni ambientali. D'altra parte, solo pochi batteri, come *Streptococcus pneumoniae* o *Bacillus spp.*, mostrano una capacità naturale di assorbire il DNA dal loro ambiente (Schwarz *et al.*, 2001).

La **trasduzione** descrive un processo di trasferimento mediato da batteriofagi. La diffusione dei geni di resistenza attraverso la trasduzione è fortemente influenzata dalla quantità limitata di DNA che può essere impacchettata in una testa fagica e dalla richiesta di specifici recettori per l'adesione dei fagi sulla superficie della nuova cellula ospite. Tale processo è comunemente osservato tra batteri della stessa specie, raramente si osserva tra batteri di specie e generi diversi (Schwarz *et al.*, 2001).

La **coniugazione** è il processo mediante il quale una molecola di DNA, generalmente un trasposone o un plasmide coniugativo, viene trasferito da una cellula batterica donatrice ad una ricevente fisicamente associata attraverso un

apparato di coniugazione. Sebbene i principi meccanicistici alla base del processo siano gli stessi, si riscontra una notevole diversità nei sistemi coniugativi dei Gram-negativi e dei Gram-positivi (Heuer *et al.*, 2007). La coniugazione sembra avere un ruolo di primaria importanza per la diffusione dei geni di resistenza tra batteri di specie e generi differenti in popolazioni miste batteriche, come si osserva sulla pelle e sulla mucosa del tratto alimentare, respiratorio e genitale di umani e animali (Schwarz *et al.*, 2001).

Inoltre, plasmidi, trasposoni e cassette geniche/integroni si diffondono verticalmente durante la divisione della cellula ospite, garantendo in tal modo un trasferimento intergenerazionale dei geni di resistenza (Schwarz *et al.*, 2001).

2.1.3 Meccanismi di resistenza agli antibiotici

I principali meccanismi di resistenza che le specie batteriche possono sviluppare nei confronti dei farmaci antimicrobici sono:

a. Inattivazione enzimatica

E' stata descritta nei batteri Gram-positivi e Gram-negativi un'ampia varietà di enzimi in grado di inattivare le molecole antibiotiche attraverso reazioni di trasferimento di gruppi funzionali su siti bersaglio specifici. Tali enzimi risultano coinvolti nella resistenza al cloramfenicolo, agli aminoglicosidi e ai macrolidi.

La resistenza al cloramfenicolo viene conferita dall'azione dell'enzima cloramfenicolo acetiltransferasi (Cat) che catalizza il trasferimento di gruppi acetile nelle posizioni C1 e C3 della molecola antibiotica. Il cloramfenicolo acetilato perde la capacità di inibire la sintesi proteica della cellula batterica.

E' stata documentata l'espressione di geni *cat* in cocchi gram + come *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* oltre che nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

L'attività di enzimi come N-acetiltransferasi, O-adeniltransferasi o O-fosfotransferasi è stata riscontrata in batteri con fenotipo resistente agli aminoglicosidi. Alcuni degli enzimi inattivanti gli aminoglicosidi sono codificati da geni contenuti all'interno di integroni/cassette geniche.

Infine le fosfotransferasi codificate dai geni plasmidici *mph* sono state rilevate in *Escherichia coli* e nello *Staphylococcus* resistente ai macrolidi (Schwarz *et al.*, 2001).

Altro meccanismo di resistenza per inattivazione enzimatica è rappresentato dalla degradazione della molecola antibiotica ad opera di enzimi come β -lattamasi, idrolasi ed esterasi (Schwarz *et al.*, 2001).

In particolare, il ruolo delle β -lattamasi è ad oggi ampiamente studiato: nei batteri Gram-negativi, comprese le *Enterobacteriaceae*, la produzione di β -lattamasi che idrolizzano l'anello β -lattamico inattivando il farmaco, è la causa predominante di resistenza ai β -lattamici. La diffusione della resistenza a questa classe di antibiotici è correlata ad un costante aumento in Europa del numero di decessi per infezioni dovute a *E.coli* e *K.pneumoniae* resistenti (De Angelis *et al.*, 2020).

b. Riduzione dell'accumulo intracellulare per ridotto assorbimento

La diminuzione dell'assorbimento del farmaco è riconducibile a:

- Una ridotta espressione, alterazione strutturale o perdita di porine attraverso le quali gli antibiotici entrano nella cellula batterica.
- Un cambiamento nella carica dei lipopolisaccaridi (LPS) della parete cellulare.

Un esempio a riguardo è rappresentato dalla resistenza agli aminoglicosidi descritta in *Pseudomonas aeruginosa* e associata ad alterazioni a carico del LPS che impediscono agli antibiotici di attraversare la membrana esterna. In *Escherichia coli* invece una diminuzione dell'uptake di β -lattamici è stata correlata ad una ridotta espressione delle porine OmpF e OmpC (Schwarz *et al.*, 2001).

c. Riduzione dell'accumulo intracellulare per aumentata estrusione

Le pompe di efflusso associate alla membrana giocano un ruolo importante nella resistenza multifarmaco. I geni di resistenza che codificano per le proteine di efflusso sono stati rilevati su plasmidi, trasposoni e cassette geniche (Schwarz *et al.*, 2001).

Ampiamente espressi nei batteri Gram-negativi, vengono descritti come sistemi in grado di trasportare le molecole antibiotiche al di fuori della cellula batterica mediante processi dipendenti dall'energia. Questo efflusso riduce la concentrazione intracellulare di antibiotici, garantendo la sopravvivenza dei batteri (Blair *et al.*, 2014).

Alcuni sistemi di efflusso esportano principalmente una ristretta gamma di substrati strutturalmente correlati; al contrario, esiste anche un gran numero di trasportatori multifarmaco in grado di esportare una varietà di composti tossici inclusi agenti antimicrobici.

Le pompe di efflusso rappresentano il meccanismo alla base della resistenza alle tetracicline e ai fluorochinoloni. In quest'ultimo caso sono rappresentati da trasportatori multifarmaco in grado di esportare, oltre ai chinoloni, un'ampia gamma di altre sostanze tossiche dalla cellula batterica (Schwarz *et al.*, 2001).

d. *Alterazione dei siti bersaglio cellulari*

Tale meccanismo di resistenza può esplicarsi attraverso:

- Sintesi di proteine protettive del ribosoma che conferiscono resistenza alle tetracicline, identificate nei Gram-positivi e nei Gram-negativi e codificate dai geni *tet*.
- Modifica chimica del sito bersaglio della molecola antibiotica ad opera di rRNA metilasi (codificate dai geni *erm*). Questa metilazione conferisce resistenza crociata a macrolidi, lincosamidi e composti B di streptogramine.
- Sostituzione di una struttura bersaglio sensibile con una resistente. L'esempio più noto e studiato di questo meccanismo è relativo all'acquisizione di PBP resistenti ai β -lattamici che sostituiscono i PBP sensibili, portando alla resistenza alla meticillina nello *Staphylococcus aureus*. Gli isolati di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) sono resistenti non solo a tutte le penicilline, ma anche alle cefalosporine, ai carbapenemi e ai monobattami. Un altro esempio di

questo meccanismo di resistenza è rappresentato dalla produzione da parte di generi batterici come *Clostridium*, *Neisseria*, *Brucella*, di enzimi deidrofolato redattasi (DHFR) con minore affinità per il trimethoprim che rendono gli stessi intrinsecamente resistenti all'antibiotico.

- Mutazioni che modificano il sito target dell'antimicrobico. Esempi di questo meccanismo sono rappresentati da:
 - Mutazioni nell'rRNA 16S, consistente nel cambiamento di una singola base, in grado di conferire resistenza alla streptomicina e alla tetracicline.
 - Mutazioni nell'rRNA 23S, associate alla resistenza ai macrolidi.
 - Mutazioni nel gene codificante la proteina ribosomiale S12, responsabili della resistenza alla streptomicina.
 - Mutazioni nei geni *gyrA* e *gyrB*, codificanti la DNA girasi, e nei geni *parC* e *parE*, codificanti la DNA topoisomerasi IV, sono state associate alla resistenza ai fluorochinoloni e rilevate in un'ampia gamma di batteri Gram-positivi e Gram-negativi di importanza umana e veterinaria (Schwarz *et al.*, 2001).

2.2 Uso degli antimicrobici nell'uomo e negli animali

La somministrazione di agenti antimicrobici negli esseri umani così come negli animali solleva un potenziale rischio per la selezione di batteri resistenti agli antibiotici (Schwarz *et al.*, 2001).

Ciò è riconducibile al fatto che l'uso degli antibiotici esercita una pressione selettiva sulle comunità microbiche, portando i ceppi ad acquisire la capacità di sopravvivere e proliferare anche in presenza di una certa concentrazione di farmaco (Schwarz *et al.*, 2001).

Nell'uomo i farmaci antimicrobici sono utilizzati principalmente per il trattamento di infezioni cliniche (McEwen *et al.*, 2018). La profilassi antibiotica è invece limitata a particolari circostanze: in chirurgia è raccomandata nel decorso post-operatorio che segue alcuni tipi di interventi; viene inoltre eseguita in caso di esposizione a patogeni altamente trasmissibili o pericolosi come Meningococco e agenti infettivi responsabili di MTS quali *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoeae*.

In medicina veterinaria ci sono notevoli differenze nel modo in cui gli antimicrobici vengono utilizzati negli animali da compagnia rispetto agli animali da produzione alimentare. Nel primo caso le pratiche di uso degli antimicrobici sono sostanzialmente simili a quelle negli esseri umani: vengono

somministrati nei singoli animali a scopo terapeutico o profilattico (McEwen *et al.*, 2018).

Diversamente, negli animali da produzione alimentare il trattamento individuale risulta spesso impraticabile essendo gli stessi allevati in gruppi numerosi: in questi casi si preferisce il trattamento di gruppo (Schwarz *et al.*, 2001). Con tale regime di trattamento, per ragioni di praticità ed efficienza, i farmaci vengono solitamente somministrati attraverso mangime o acqua (McEwen *et al.*, 2018).

Inoltre, negli animali da reddito le sostanze con attività antimicrobica vengono utilizzate per scopi differenti: trattamento delle malattie, prevenzione e controllo delle infezioni batteriche, promozione della crescita (Marshall *et al.*, 2011).

L'**uso terapeutico** di agenti antimicrobici ha lo scopo di contrastare un'infezione batterica esistente (Schwarz *et al.*, 2001). Solitamente nei grandi allevamenti, quando un numero limitato di animali viene identificato come infetto, si intraprende il trattamento l'intera mandria o gregge al fine prevenire un'ulteriore estensione dell'infezione. Tale pratica viene definita **metafilassi** (Schwarz *et al.*, 2001).

La terapia precoce per l'intero gruppo di animali può ridurre il numero di animali malati e/o morti e può anche diminuire la quantità di agenti

antimicrobici necessari, riducendo di conseguenza i costi del trattamento (Schwarz *et al.*, 2001).

Contrariamente all'uso terapeutico e metafilattico degli antimicrobici, la **profilassi** è una misura esclusivamente preventiva che può essere somministrata sia su singoli animali che su gruppi di animali. La profilassi antibiotica in ambito veterinario risulta inevitabile in determinate circostanze e in alcuni periodi chiave della vita animale, durante i quali gli animali sono riconosciuti come maggiormente suscettibili alle infezioni (Schwarz *et al.*, 2001).

E' quanto si verifica nelle vacche da latte, in cui la somministrazione profilattica intra-mammaria di antimicrobici è raccomandata al termine del periodo di lattazione per prevenire la mastite; negli allevamenti di suini e bovini viene attuato un trattamento antibiotico preventivo nel periodo dello svezzamento. Viene inoltre eseguito un trattamento profilattico in caso di mescolamento di animali provenienti da diversi allevamenti.

Tuttavia, l'applicazione profilattica degli antimicrobici è stata criticata rispetto ad un possibile coinvolgimento nella selezione della resistenza tra i batteri patogeni.

Ancora più criticamente valutato è l'uso di antibiotici per la **promozione della crescita** negli animali da produzione alimentare (Schwarz *et al.*, 2001).

I promotori della crescita contribuiscono in modo importante alla resistenza antimicrobica perché vengono somministrati ad interi gruppi di animali, generalmente per periodi di tempo prolungati e a dosi sub-terapeutiche, condizioni che favoriscono la selezione e la diffusione di batteri resistenti all'interno e tra gruppi di animali, nonché all'uomo attraverso la catena alimentare (McEwen *et al.*, 2018).

L'impiego degli antibiotici per fini non terapeutici risale alla metà degli anni '50 (Marshall *et al.*, 2011).

I farmaci più comunemente utilizzati a tale scopo includevano i macrolidi, i polipeptidi (bacitracina), i glicopeptidi (avoparcina), le streptogramine (Guardabassi, 2008).

Negli anni successivi è emerso che negli allevamenti in cui venivano utilizzati gli antibiotici come promotori della crescita, si rilevava una maggiore presenza di batteri resistenti nella flora intestinale degli animali e degli allevatori rispetto a quelli di animali e persone di allevamenti in cui tale pratica non era attuata (Marshall *et al.*, 2011).

Il Rapporto Swann del 1969 è stata la base per lo sviluppo di politiche e regolamentazioni inerenti l'uso prudente degli antimicrobici in molti paesi (Guardabassi *et al.*, 2008).

Nel Rapporto in questione veniva sottolineato per la prima volta che *“la somministrazione di antibiotici al bestiame d'allevamento, a livelli sub-terapeutici, pone un rischio per la salute umana e animale”*. Inoltre, si raccomandava l'utilizzo come promotori della crescita dei soli agenti antimicrobici di scarsa applicazione nel trattamento di infezioni umane, al fine di preservarne l'efficacia (Swann *et al.*, 1969).

Alcuni paesi, inclusa l'UE, hanno gradualmente vietato l'uso non terapeutico degli antimicrobici (Guardabassi *et al.*, 2008).

Con il Regolamento CE 1831/2003 sugli additivi destinati all'alimentazione animale è stato imposto il divieto dell'uso degli antibiotici come promotori della crescita a partire dal 1° gennaio 2006.

2.3 Rischio per la salute umana associato al consumo di antimicrobici negli animali

L'utilizzo delle stesse classi di antimicrobici nell'uomo e negli animali ha portato all'insorgenza di problemi legati alla capacità di trattare efficacemente le infezioni umane. A tal proposito un esempio documentato in letteratura è relativo alla colistina, a lungo utilizzata nel settore animale per scopi terapeutici, profilattici e per promuovere la crescita. I primi dati relativi alla resistenza alla colistina sono emersi con l'avvio nel 2014 del Piano di monitoraggio obbligatorio della resistenza in Europa.

Recentemente lo stesso antimicrobico è stato rivalutato nell'uso clinico come farmaco di ultima istanza per il trattamento di infezioni umane sostenute da batteri Gram-negativi multiresistenti.

Da quanto affermato emerge che la diffusione della resistenza alla colistina ne comprometterebbe l'uso nell'uomo, limitando ulteriormente le possibilità terapeutiche (McEwen *et al.*, 2018).

Ulteriore rischio associato al consumo di antimicrobici nel settore animale risiede nel fatto che i batteri resistenti che colonizzano e infettano le specie animali possono essere trasmessi all'uomo attraverso il contatto diretto con gli animali, mediante la catena alimentare o tramite ambienti contaminati (Guardabassi *et al.*, 2008).

Per quanto concerne l'acquisizione della resistenza attraverso il contatto diretto con gli animali, è necessario sottolineare che allevatori, veterinari, addetti alla macellazione sono direttamente esposti al rischio di essere colonizzati o infettati da batteri resistenti di origine animale. Di fatto, tali figure lavorative forniscono un canale per l'ingresso di geni di resistenza in ambito comunitario e talvolta nosocomiale, dove si verifica poi un'ulteriore diffusione degli stessi. La trasmissione diretta dei batteri patogeni dagli animali all'uomo è stata segnalata per la prima volta da Levy *et al.* nel 1976, quando è stata riscontrata la presenza degli stessi ceppi di *Escherichia coli* resistenti alle tetracicline nella flora intestinale degli allevatori di polli e nel pollame a cui veniva somministrato mangime con aggiunta dell'antimicrobico. Studi successivi hanno fornito ulteriori prove circa l'origine animale dei batteri resistenti che colonizzano o infettano gli esseri umani. Da uno studio condotto nel 2007 è emerso che la metà dei lavoratori avicoli risultava colonizzata da *E.coli* resistente alla gentamicina, antibiotico più comunemente usato negli allevamenti di pollame, al contrario solo il 3% dei lavoratori non avicoli era colonizzata dal ceppo batterico in esame (Marshall *et al.*, 2011).

Al contrario, i consumatori possono acquisire batteri resistenti attraverso il consumo di alimenti di origine animale. La via di trasmissione alimentare è

stata riconosciuta come la principale via di diffusione dei geni di resistenza dagli animali all'uomo (Guardabassi *et al.*, 2008).

Gli studi svolti negli anni hanno evidenziato la presenza di medesimi determinanti genetici di resistenza nei batteri isolati dagli animali da reddito e nei prodotti alimentari da essi derivati, fornendo di fatto prove relative del trasferimento dell'antibiotico-resistenza attraverso la filiera alimentare.

Sebbene in passato il passaggio di batteri zoonotici resistenti dagli animali all'uomo attraverso la via alimentare sia risultato spesso difficile da provare e da discernere rispetto alle altre possibili vie di trasmissione, l'avvento di nuove tecniche molecolari ha permesso di fornire nuove prove a riguardo (Marshall *et al.*, 2011).

Infine, ricerche recenti indicano l'ambiente come una componente importante per la trasmissione di batteri resistenti. Si stima che dal 75% al 90% degli antibiotici utilizzati negli allevamenti siano escreti, in gran parte non metabolizzati, nell'ambiente. Inoltre, gli antimicrobici sono stati rilevati nelle polveri degli allevamenti, nelle falde acquifere ad essi associate, nei suoli trattati con letame. Il rilascio di antibiotici nell'ambiente espone innumerevoli microrganismi ambientali a quantità minime di molecole antibatteriche, sufficienti a selezionare nelle specie microbiche i fenotipi di resistenza (Marshall *et al.*, 2011).

Da quanto esposto emerge la necessità di ridurre l'uso degli antibiotici negli animali da produzione alimentare, sostituendoli ove possibile, al fine di preservare la salute pubblica e animale (OECD, 2022).

2.4 Antibiotico-resistenza: la strategia One Health

L'antibiotico-resistenza viene attualmente annoverata tra i principali problemi di sanità pubblica, con un forte impatto sia nell'ambito clinico che economico. L'Italia da anni è tra i Paesi in Europa con le più alte percentuali di resistenza alle principali classi di antibiotici. A tal proposito, nel 2001 è stato istituito dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), un sistema di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza con l'obiettivo primario di descrivere frequenza e andamento delle resistenze in un gruppo di patogeni rilevanti dal punto di vista epidemiologico e clinico (ISS, 2021).

La resistenza antimicrobica rimane comunque una sfida globale che richiede una collaborazione internazionale (OECD, 2022). Si è reso necessario pertanto un approccio "One Health" definito come uno sforzo collaborativo di più discipline e istituzioni (medicina umana e veterinaria, settore agro-alimentare, ambiente) che operano a livello locale, nazionale e globale per raggiungere una salute ottimale per le persone, gli animali e l'ambiente.

L'approccio One Health è fondamentale per il raggiungimento dei cinque obiettivi delineati nel Piano d'azione globale sulla resistenza antimicrobica dell'OMS. Gli obiettivi stabiliti dall'Assemblea mondiale della sanità nel 2015 sono i seguenti (WHO, 2015):

- Migliorare la consapevolezza e la comprensione della resistenza antimicrobica attraverso un'efficace comunicazione, istruzione e formazione
- Rafforzare la conoscenza e l'evidenza attraverso la sorveglianza e la ricerca
- Ridurre l'incidenza delle infezioni attraverso efficaci misure igienico-sanitarie, igieniche e di prevenzione
- Ottimizzare l'uso dei farmaci antimicrobici nella salute umana e animale;
- Aumentare gli investimenti economici in nuovi farmaci, strumenti diagnostici, vaccini e altri interventi.

Nonostante queste misure, i dati disponibili indicano che a livello globale l'uso di antimicrobici è ancora elevato sia nel settore umano che animale (McEwen *et al.*, 2018).

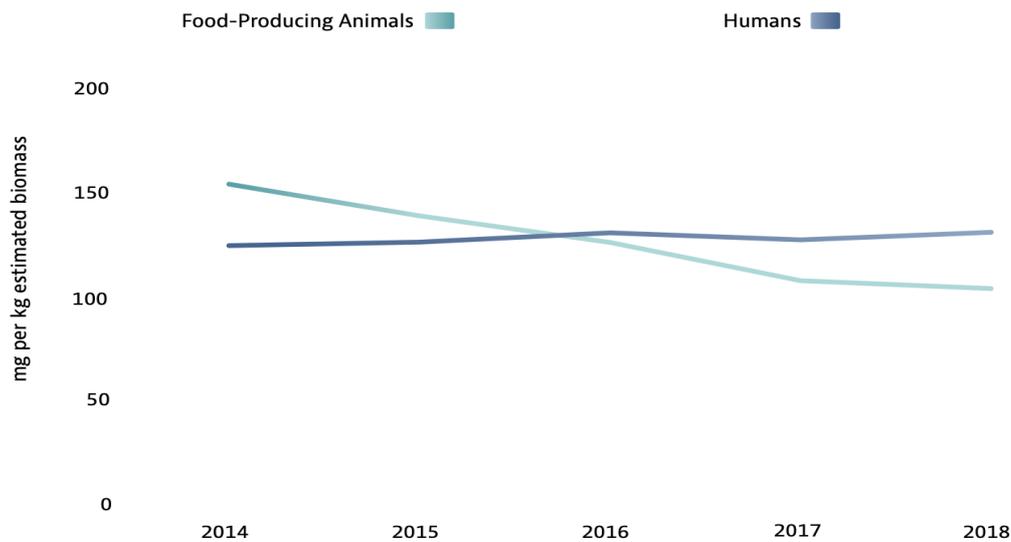


Figura 7. Consumo degli antibiotici nell'uomo e negli animali da produzione alimentare in UE nel periodo 2014-2018. Da "Antimicrobial resistance in the EU/EEA. A One Health response". OECD, ECDC, EFSA, EMA. (2022).

I dati raccolti dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e dall'Agenzia europea per i medicinali (EMA), relativi all'utilizzo degli antimicrobici nella sanità umana e animale, nel periodo 2014-2018, evidenziano un consumo medio di antibiotici negli esseri umani ora superiore a quello degli animali da produzione alimentare (*Figura 7*).

Questa tendenza suggerisce che le misure adottate sul territorio europeo per ridurre l'uso di antibiotici negli animali da produzione alimentare si sono rivelate efficaci.

Inoltre, dalle stesse analisi è emerso che il consumo complessivo di antibiotici nell'uomo nell'Unione europea è diminuito del 23% tra il 2011 e il 2020.

Sebbene i dati suggeriscano una riduzione del consumo di antibiotici sia negli esseri umani che negli animali da produzione alimentare, la resistenza antimicrobica rimane una seria sfida nell'UE e ciò è testimoniato dal fatto che le resistenze nei batteri sono in aumento dal 2011 per molte combinazioni antibiotico-batterio (OECD, 2022).

2.5 Resistenza antimicrobica nel genere batterico *Brucella spp.*

I primi lavori relativi a saggi di suscettibilità agli antibiotici di isolati di *Brucella spp.* risalgono alla metà degli anni '50.

Tra questi, uno studio condotto da Ravaioli L. presso l'Istituto Superiore di Sanità sottolineava la non concordanza tra l'attività in vitro e in vivo dei farmaci testati e saggiava la sensibilità di ceppi di *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* nei confronti degli antibiotici più comunemente utilizzati al tempo per il trattamento della zoonosi, quali streptomicina, terramicina, aureomicina e cloramfenicolo sintetico (cloromicetina), definendo una sensibilità differente delle tre specie nei confronti delle molecole antimicrobiche in esame (Ravaioli, 1954).

Relativamente agli anni successivi al 1950, si osserva in letteratura una scarsità di lavori inerenti il tema in questione che di fatto denota un interesse carente per l'argomento.

Nel 1986 vengono pubblicate ricerche interessanti: uno studio spagnolo focalizza l'attenzione sui casi di recidiva confrontando i valori di MIC dei ceppi isolati nell'infezione primaria con quelli dei ceppi isolati dagli stessi pazienti nel corso della ricaduta, senza ottenere di fatto prove sufficienti per una possibile correlazione tra lo sviluppo delle resistenze durante il trattamento e la ricomparsa della malattia (Ariza *et al.*, 1986).

Nello stesso anno viene documentata per la prima volta la comparsa della resistenza alla rifampicina durante la doppia terapia con doxiciclina in un caso di infezione umana da *B. melitensis*.

Isolati di *Brucella* - principalmente *B. melitensis* - che mostrano resistenza alla rifampicina sono stati descritti negli anni seguenti in Turchia e, più recentemente, in Egitto e Qatar.

Parallelamente altri lavori hanno evidenziato un aumento dei tassi di resistenza al trimetoprim-sulfametossazolo (Trott *et al.*, 2018).

Pochi studi hanno invece esaminato la suscettibilità antimicrobica degli isolati veterinari di *Brucella spp*: uno di questi è stato condotto in Brasile su 147 ceppi di *B. abortus* isolati da bovini e ha evidenziato una suscettibilità ridotta alla rifampicina per il 36,7% degli isolati in esame e un fenotipo resistente per tre ceppi (2%). Uno studio simile è stato condotto in Corea con risultati analoghi (Trott *et al.*, 2018).

Per quanto concerne il territorio nazionale, un gruppo di ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità ha focalizzato l'attenzione sulle basi genetiche della resistenza o della ridotta suscettibilità agli agenti antimicrobici utilizzati nella brucellosi e ha identificato in cloni di *B. melitensis* Rif^R prodotti in laboratorio, la presenza di mutazioni chiave nel gene *rpoB* (Marianelli *et al.*, 2004). I dati presenti in letteratura suggeriscono tuttavia la necessità di ulteriori ricerche volte a trovare meccanismi alternativi di resistenza alla rifampicina dal momento che le mutazioni del gene *rpoB* sembrano non sempre correlare al fenotipo resistente degli isolati.

La resistenza antimicrobica in *Brucella spp.* rimane ancora oggi scarsamente investigata: il test di suscettibilità agli antimicrobici non è raccomandato come pratica routinaria a causa del rischio per il personale di laboratorio associato alla manipolazione del patogeno. La maggior parte degli studi consultabili a riguardo è stata intrapresa nei paesi endemici per la brucellosi utilizzando metodi differenti quali macrodiluizione e microdiluizione in brodo, diluizione in agar e, più recentemente, E-test.

La mancanza di un metodo universalmente accettato limita la comparazione dei dati forniti dai diversi paesi e, secondo alcuni studiosi, è alla base delle disparità nelle frequenze di resistenza osservate (Trott *et al.*, 2018).

3.PARTE SPERIMENTALE

3.1 *Scopo del lavoro*

È ormai noto che l'uso di antimicrobici negli animali e nell'uomo può selezionare popolazioni batteriche resistenti.

I fenotipi di resistenza agli antimicrobici sono comunemente studiati nei batteri patogeni zoonotici quali *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* che, attraverso il loro ruolo di contaminanti alimentari, si rendono responsabili della trasmissione di resistenze dagli animali all'uomo (White *et al.*, 2002).

Contrariamente, i dati attualmente disponibili per i batteri patogeni del genere *Brucella* sono ancora insufficienti per definire un trend globale dell'antibiotico-resistenza nel genere batterico in questione.

I lavori pubblicati nell'ultimo decennio relativi a studi condotti nei paesi con i tassi di incidenza di brucellosi più elevati, sembrano evidenziare la comparsa di fenotipi resistenti agli antimicrobici raccomandati dall'OMS per il trattamento della zoonosi nell'uomo, in particolar modo alla rifampicina.

In Italia la brucellosi risulta ancora ampiamente distribuita nelle regioni del Sud Italia dove i programmi di eradicazione sono ostacolati dal mancato controllo dei movimenti degli animali, dalla ritardata eliminazione degli animali infetti e dalle pratiche tradizionali di allevamento (Marianelli *et al.*, 2007).

Tuttavia finora non si hanno informazioni circa l'eventuale presenza di resistenze antimicrobiche in *Brucella spp.* a causa della mancanza di studi a riguardo.

Il lavoro in questione si propone come obiettivo l'analisi dell'antibiotico-resistenza in ceppi di campo di *Brucella spp.* isolati sul territorio italiano dal 2019 ad oggi, attraverso il metodo della microdiluizione in brodo.

I dati raccolti saranno utilizzati per la determinazione dei tassi di prevalenza delle resistenze agli antimicrobici con particolare riguardo alle specie *Brucella melitensis* e *Brucella abortus*.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Campioni

Nel seguente studio sono stati utilizzati ceppi batterici di *Brucella* appartenenti alla collezione del Laboratorio di Referenza OIE per le Brucellosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale" (IZSAM). Nello specifico sono stati presi in considerazione ceppi isolati nel periodo compreso tra Gennaio 2019 ed Aprile 2022 da casi accertati di brucellosi umana e animale, verificatisi sul territorio nazionale.

L'isolamento primario dei ceppi è stato eseguito presso i laboratori diagnostici degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali presenti sul territorio nazionale, seguendo le procedure descritte nel Manuale OIE dei Test diagnostici e vaccini. Gli stessi sono stati tipizzati per la specie e i biovar dal Centro di Referenza OIE per le Brucellosi dell'IZSAM.

I ceppi analizzati sono stati isolati da campioni di organi e tessuti animali prelevati nel corso delle attività svolte nell'ambito del Piano nazionale di eradicazione delle brucellosi.

La maggior parte dei campioni è stata raccolta presso allevamenti di bestiame, nello specifico allevamenti di bufali, bovini e ovo-caprini, localizzati nelle regioni Sicilia, Campania, Puglia, Molise, Calabria e Basilicata. L'isolamento

è stato condotto da differenti matrici: utero, secrezioni vaginali, feti abortiti, membrane fetali, mammella, latte, linfonodi, organi interni come milza, fegato, polmone.

A questi si aggiungono campioni prelevati da animali da compagnia ovvero cani: il campionamento è stato effettuato in allevamenti della provincia di Ancona e l'isolamento è stato eseguito dal sangue.

Altri campioni provengono da carcasse di animali selvatici - cinghiali - recuperate nel territorio piemontese nel periodo 2007-2012. Infine sono stati esaminati ceppi di *Brucella* isolati da campioni umani di sangue.

In totale sono stati utilizzati per lo studio 163 ceppi di campo di *Brucella*, diversificati per specie e biotipo oltre che per la specie ospite, secondo quanto riportato nella Tabella 1.

In aggiunta, l'analisi è stata condotta su due ceppi batterici di *Ochrobactrum anthropi*, isolati rispettivamente da un uomo e da un bovino (Tabella 1), affetti da sintomatologia simil-brucellotica.

<i>Brucella spp.</i>	Specie ospite							Tot.
	bufali	bovini	ovini	caprini	uomo	cani	cinghiali	
<i>B.abortus</i> bv. 1	50	4						54
<i>B.melitensis</i> bv. 3		6	37	14	4			61
<i>B.abortus</i> bv. 3		42						42
<i>B.canis</i>						2		2
<i>B.suis</i>							4	4
<i>Ochrobactrum</i>		1			1			2
								165

Tabella 1. Totale ceppi batterici di *Brucella* testati.

4.2 Test di suscettibilità agli antibiotici

4.2.1 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

I ceppi in esame sono stati testati per valutare la suscettibilità nei confronti di nove agenti antimicrobici regolarmente utilizzati nel trattamento della brucellosi umana.

Il ceppo di riferimento *Escherichia coli* ATCC 25922 è stato utilizzato come ceppo di controllo della qualità per i test di sensibilità; i ceppi di riferimento *Brucella melitensis* biovar 1 16M e *Brucella abortus* biovar 3 Tulya sono stati inoltre utilizzati come controlli per l'identificazione, la biotipizzazione e il test di suscettibilità antimicrobica.

La minima concentrazione di farmaco in grado di inibire *in vitro* la crescita batterica (MIC) è stata determinata attraverso il metodo della microdiluzione in brodo.

A tal fine sono state utilizzate le micropiastre commerciali MICRONAUT-S Gram-negative (MERLIN Diagnostics GmbH, Bornheim-Hersel Germany), a 96 pozzetti contenenti gli antibiotici in concentrazioni scalari.

Nella Tabella 2 sono riportati gli antimicrobici e i relativi range di concentrazione ($\mu\text{g/mL}$) testati. In Figura 8 è riportato uno schema rappresentativo delle micropiastre utilizzate.

Agenti antimicrobici	Range di concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)
Gentamicina (GEN)	0.004 - 8
Streptomicina (STR)	0.008 - 16
Doxicilina (DOX)	0.004 - 8
Tetraciclina (TET)	0.004 - 8
Cloramfenicolo (CMP)	0.5 - 8
Rifampicina (RAM)	0.125 - 8
Trimetoprim/Sulfametossazolo (T/S)	4/76 - 0.002/0.04
Ciprofloxacina (CIP)	0.002 - 4
Levofloxacina (LEV)	0.004 - 4

Tabella 2. Agenti antimicrobici e range di concentrazione utilizzati.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	GEN 0,5	GEN 0,25	GEN 0,125	GEN 0,0625	GEN 0,03125	GEN 0,015625	GEN 0,0078125	GEN 0,00390625
B	STR 16	STR 8	STR 4	STR 2	STR 1	STR 0,5	STR 0,25	STR 0,125	STR 0,0625	STR 0,03125	STR 0,015625	STR 0,0078125
C	DOX 8	DOX 4	DOX 2	DOX 1	DOX 0,5	DOX 0,25	DOX 0,125	DOX 0,0625	DOX 0,03125	DOX 0,015625	DOX 0,0078125	DOX 0,00390625
D	TET 8	TET 4	TET 2	TET 1	TET 0,5	TET 0,25	TET 0,125	TET 0,0625	TET 0,03125	TET 0,015625	TET 0,0078125	TET 0,00390625
E	CMP 8	CMP 4	CMP 2	CMP 1	CMP 0,5	RAM 8	RAM 4	RAM 2	RAM 1	RAM 0,5	RAM 0,25	RAM 0,125
F	T/S 4/76	T/S 2/38	T/S 1/19	T/S 0,5/9,5	T/S 0,25/4,75	T/S 0,125/2,375	T/S 0,0625/ 1,1875	T/S 0,03125/ 0,59375	T/S 0,015625/ 0,296875	T/S 0,0078125/ 0,1484375	T/S 0,00390625/ 0,074218	T/S 0,001953125/ 0,03710
G	CIP 4	CIP 2	CIP 1	CIP 0,5	CIP 0,25	CIP 0,125	CIP 0,0625	CIP 0,03125	CIP 0,015625	CIP 0,0078125	CIP 0,00390625	CIP 0,001953125
H	LEV 4	LEV 2	LEV 1	LEV 0,5	LEV 0,25	LEV 0,125	LEV 0,0625	LEV 0,03125	LEV 0,015625	LEV 0,0078125	LEV 0,00390625	GC

Figura 8. Schema rappresentativo delle micropiastre utilizzate.

Le micropiastre sono state allestite facendo riferimento al seguente protocollo:

a. Coltivazione dei ceppi

Il test della suscettibilità agli antibiotici viene eseguito su colture pure e fresche.

I ceppi di *Brucella* da testare e il ceppo di riferimento *E.coli* ATCC 25922 vengono seminati su Agar Columbia e posti rispettivamente in condizioni ottimali per la crescita, riportate nella Tabella 3:

Microrganismo	Terreno di coltura	Condizioni di incubazione	Tempo di incubazione
<i>Brucella spp.</i>	Agar Columbia	37°C + 5% CO ₂	96 h
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Agar Columbia	37°C	24 h

Tabella 3. Terreno di coltura e condizioni di crescita dei microrganismi.

b. Preparazione dell'inoculo

- Stemperare le colonie batteriche in 5ml di NaCl 0.9% in modo da ottenere una torbidità pari a 0.5 McFarland, corrispondente ad un valore di $OD_{600} = 0.090$
- Preparare una diluizione 1:10 in NaCl dei ceppi di *Brucella* da testare
- Il ceppo di riferimento *E.coli* ATCC 25922 viene conservato tal quale
- Inoculare le sospensioni batteriche così preparate nel brodo CAMHB (Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth), secondo i volumi indicati nella Tabella 4:

Microrganismo	Volume sospensione batterica	Volume CAMHB
<i>Brucella spp.</i>	400 µl	22 ml
<i>E.coli</i> ATCC 25922	100 µl	11 ml

Tabella 4. Preparazione dell'inoculo.

c. Allestimento e incubazione delle micropiastre.

- Aprire la confezione della micropiastre (max. 30 minuti prima dell'uso)
- Etichettare la micropiastre con codice identificativo del ceppo testato e data
- Pipettare in ogni pozzetto della micropiastre 100 µl dell'inoculo utilizzando una pipetta multicanale

- Coprire la micropiastro con una pellicola adesiva
- Incubare le micropiastre nelle condizioni riportate in Tabella 5:

Microrganismo	Temperatura	Tempo di incubazione
<i>Brucella spp.</i>	37°C in assenza di CO2 *	48 h
<i>E.coli</i> ATCC 25922	37°C in assenza di CO2	24 h

Tabella 5. Condizioni di incubazione delle micropiastre.

d. Determinazione della carica dell'inoculo

- Vortexare l'inoculo per almeno 10 secondi
- Pipettare 10 µl dell'inoculo in 10ml di NaCl. Vortexare per 10 secondi
- Pipettare 100 µl della soluzione su un piastra di Agar Columbia e seminare per spatolamento
- Incubare le piastre nelle condizioni suggerite nella Tabella 6:

Microrganismo	Condizioni di incubazione	Tempo di incubazione
<i>Brucella spp.</i>	37°C + 5% CO2	48-72 h
<i>E.coli</i> ATCC 25922	37°C	24 h

Tabella 6. Condizioni di incubazione delle piastre per la conta delle UFC.

e. Lettura delle micropiastre e conta delle UFC

- Verificare la crescita del ceppo nel pozzetto di controllo della micropiastro (GC= growth control)
- Determinare i valori di MIC per ciascun antibiotico testato attraverso una lettura visiva della micropiastro
- Acquisire una lettura in assorbanza delle micropiastre utilizzando il Lettore TECAN Sunrise microplate reader, impostando la lunghezza d'onda a 450 nm
- Acquisire un'immagine della micropiastro utilizzando il lettore Sensititre Vizion Digital MIC Viewing System (Thermo Scientific)
- Effettuare la conta delle unità formanti colonie (UFC) moltiplicando per 1×10^4 . Il numero di colonie del ceppo di riferimento *E.coli* ATCC 25922 deve essere compreso tra 20 e 80.

Osservazioni (*) : le micropiastre per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) sono state incubate a 37°C senza CO₂, ad eccezione dei ceppi di *Brucella abortus* bv.1, posti in presenza di CO₂.

4.2.2 Interpretazione dei risultati

Al fine di garantire accuratezza e riproducibilità del test di sensibilità agli antimicrobici effettuato, è stato verificato che i valori di MIC ottenuti per il ceppo di riferimento *E.coli* ATCC 25922 fossero in linea con i range di valori stabiliti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Nello specifico è stata utilizzata la Tabella 23A “*MIC: Quality control ranges for nonfastidious organisms (Unsupplemented Cation-adjusted Muller-Hinton Broth)*” della Guideline M45 “*Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*”, pubblicata dal CLSI 3rd ed. (2015).

I valori di riferimento sono riportati di seguito (Tabella 7):

Antibiotico	MIC ranges (µg/ml)
Gentamicina	0.25 - 1
<i>Streptomicina</i>	0.5 - 4
<i>Doxiciclina</i>	0.5 - 2
Tetraciclina	0.5 - 2
Cloramfenicolo	2 - 8
Rifampicina	4 - 16
Trimetoprim/Sulfametossazolo	≤ 0.5/9.5
Ciprofloxacina	0.004 - 0.015
Levofloxacina	0.008 - 0.06

Tabella 7. Range di valori di MIC per il ceppo di controllo *E.coli* ATCC 25922.

Nella Tabella 23A non sono indicati i range di riferimento per gli agenti antimicrobici Streptomicina e Doxiciclina. Per gli stessi sono stati utilizzati i range stabiliti per altre molecole antibiotiche della stessa classe quali Amikacina, appartenente alla famiglia degli aminoglicosidi come la Streptomicina, e Tetraciclina, antibiotico della classe delle tetracicine come la Doxiciclina.

In relazione ai ceppi di *Brucella* testati, i valori di MIC ottenuti sono stati rapportati con i *breakpoint* stabiliti dal CLSI, al fine di classificare ogni isolato come “Sensibile”, “Intermedio” o “Resistente” nei confronti di ciascun

antibiotico saggiato. Nello specifico le tre categorie menzionate forniscono un'indicazione circa la probabilità di successo terapeutico (CLSI, 2012):

- SENSIBILE (S) : un microrganismo è classificato come “S” quando esiste un'elevata probabilità di successo terapeutico utilizzando il dosaggio del farmaco consigliato per il tipo di infezione e l'agente infettante.
- INTERMEDIO (I) : un microrganismo viene categorizzato come “I” quando il successo terapeutico è incerto; la specie batterica in esame presenta per l'antibiotico saggiato un valore di minima concentrazione inibitoria che si avvicina ai livelli ematici e tissutali ottenibili con il dosaggio massimo possibile. Ciò non esclude l'utilizzo del farmaco per il trattamento dell'infezione qualora essa sia localizzata in un sito corporeo in cui il farmaco si concentra fisiologicamente o quando può essere utilizzato un dosaggio superiore al normale.
- RESISTENTE (R) : un microrganismo viene classificato come “R” quando esiste un'elevata probabilità di fallimento terapeutico; ciò è dovuto al fatto che l'agente infettante non è inibito dalle concentrazioni di farmaco solitamente ottenibili con il dosaggio raccomandato.

Inoltre per gli isolati per cui, a causa dell'assenza o della rara presenza di ceppi resistenti, è stato designato un solo criterio interpretativo, vale a dire il *breakpoint* della sensibilità, si fa riferimento ad una categoria aggiuntiva,

designata come “NON SUSCETTIBILE”. Questa categoria comprende i ceppi batterici che mostrano valori di concentrazione minima inibente (MIC) superiori al valore del *breakpoint* fornito. Non necessariamente la categorizzazione di un isolato come “NS” nei confronti di un agente antimicrobico saggiato implica lo sviluppo da parte del microorganismo di un meccanismo di resistenza.

Risulta necessario precisare che il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) fornisce per *Brucella spp.* i *breakpoint* di sensibilità relativi ad alcuni degli agenti antimicrobici testati: Gentamicina, Streptomina, Doxiciclina, Tetraciclina, Trimetoprim/Sulfametossazolo.

I valori di riferimento sono consultabili nella Tabella 21 “*Potential bacterial Agents of bioterrorisms*” della Guideline M45 “*Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*”, a cura del CLSI 3rd ed. (2015) e di seguito riportati (Tabella 8):

Agente antimicrobico	Criteri interpretativi MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	I	R
Gentamicina	≤ 4	–	–
Streptomicina	≤ 8	–	–
Doxiciclina	≤ 1	–	–
Tetraciclina	≤ 1	–	–
Trimetoprim/ Sulfametossazolo	$\leq 2/38$	–	–

Tabella 8. Criteri interpretativi definiti per *Brucella spp.*.

Per i restanti antimicrobici saggiati non sono stati stabiliti dal CLSI criteri interpretativi relativamente al genere batterico in esame. Si è resa pertanto necessaria la consultazione dei *breakpoint* definiti per *Haemophilus influenzae*, specie batterica accomunata a *Brucella spp.* dalla crescita lenta.

Tali valori sono riportati nella Tabella 2E “Zone diameter and MIC breakpoints for *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*” della Guideline M100 “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*”, pubblicata dal CLSI 28th ed. (2018) ed indicati di seguito (Tabella 9):

Agente antimicrobico	Criteri interpretativi MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	I	R
Cloramfenicolo	≤ 2	4	≥ 8
Rifampicina	≤ 1	2	≥ 4
Ciprofloxacina	≤ 1	–	–
Levofloxacina	≤ 2	–	–

Tabella 9. Criteri interpretativi definiti per Haemophilus influenzae.

5. RISULTATI

5.1 *Analisi dei ceppi isolati*

In questo studio sono stati analizzati ceppi batterici isolati da allevamenti di animali da reddito (ovini, caprini, bufali, bovini), animali da compagnia e fauna selvatica, riconducibili principalmente a quattro specie di *Brucella spp.*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis* e *B. suis*.

La provenienza degli isolati di *B. abortus* e *B. melitensis* (Tabella 10) riflette l'attuale distribuzione della brucellosi bovina ed ovi-caprina sul territorio italiano:

Regione di provenienza	Numero di isolati
<i>Sicilia</i>	69
<i>Campania</i>	55
<i>Puglia</i>	19
<i>Molise</i>	5
<i>Calabria</i>	4
<i>Basilicata</i>	1

Tabella 10. Provenienza dei ceppi di *B. abortus* e *B. melitensis*. analizzati.

La Sicilia risulta essere la regione con il più alto numero di ceppi analizzati: la maggior parte classificati come *B. melitensis* bv.3 e isolati da ovini, caprini e in numero minore da bovini. I restanti ceppi (23) sono stati identificati come *B. abortus* bv.3 ed isolati da bovini.

Dei 69 ceppi isolati sul territorio siciliano, 24 provenivano dalla provincia di Catania, 19 dalla provincia di Messina, 10 dalla provincia di Enna, 6 dalla provincia di Siracusa mentre il numero di ceppi isolati nelle restanti province si attesta tra 1 e 3.

La numerosità degli isolati riflette appunto la più alta prevalenza della malattia nella zona Nord-Orientale della Sicilia.

La Campania ha mostrato ceppi isolati dal bufalo che sono stati prevalentemente classificati come *B. abortus* bv. 1. Solo quattro campioni sono risultati isolati da ovini e caprini e classificati come *B. melitensis* bv.3.

La quasi totalità degli isolati analizzati (52/55) proveniva dalla provincia di Caserta.

Per quanto concerne la regione Puglia, la zona interessata dalla zoonosi risulta essere quella del foggiano: trattasi nello specifico di brucellosi bovina sostenuta da *B. abortus* bv. 3.

Per il Molise sono stati analizzati tre ceppi di *B. melitensis* bv. 3 isolati da bovini (2) e ovino (1) mentre i restanti 2 ceppi sono stati identificati come *B. abortus* bv.1 e *B. abortus* bv.3 ed isolati rispettivamente da un bufalo e da un bovino. Circa la provenienza, quattro ceppi sono stati isolati nella provincia di Isernia e un ceppo nella provincia di Campobasso.

La stessa variabilità si osserva per i campioni provenienti dalla regione Calabria: tre ceppi sono stati identificati come *B. melitensis* bv.3 ed isolati da ovi-caprini nei territori di Crotona, Reggio Calabria e Catanzaro. Un ceppo di *B. abortus* bv.3 è stato isolato nella provincia di Cosenza da un bovino.

Per la regione Basilicata è stato analizzato un solo ceppo di *B. abortus* bv.1, proveniente da un bovino della provincia di Potenza.

Il ridotto numero di campioni provenienti dalle regioni Molise, Calabria, Basilicata denota una presenza sporadica della zoonosi negli stessi territori, alcuni dei quali dichiarati indenni da brucellosi ovi-caprina e/o bovina.

In aggiunta ai ceppi di *B. abortus* e *B. melitensis*, sono stati presi in considerazione due ceppi di *B. canis* isolati da un focolaio di brucellosi canina, sviluppatasi nell'anno 2020 in un allevamento di cani di piccola taglia della provincia di Ancona.

Infine sono stati inclusi nello studio due ceppi di *B. suis* bv.2 isolati da fauna selvatica e tutti riconducibili ai territori del Nord Italia, in particolare alla regione Piemonte.

Analogamente gli isolati umani di *B. melitensis* provengono da province settentrionali della penisola appartenenti alle regioni Piemonte, Lombardia e

Umbria. Non è da escludere che si tratti di infezioni acquisite fuori dal territorio italiano, ad esempio nei paesi extra-UE endemici per la brucellosi.

5.2 Suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi testati

I valori di minima concentrazione inibente (MIC) ottenuti per i ceppi di *B. abortus* e *B. melitensis* testati nei confronti dei 9 agenti antimicrobici in esame sono riportati nelle seguenti figure:

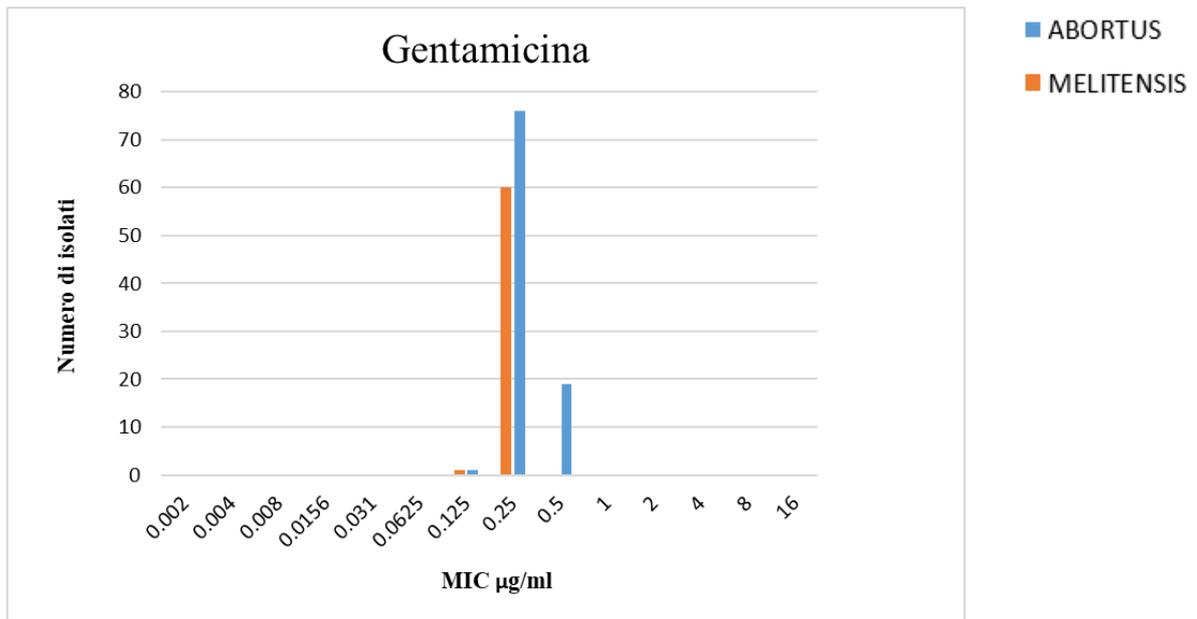


Figura 9.1. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la gentamicina.

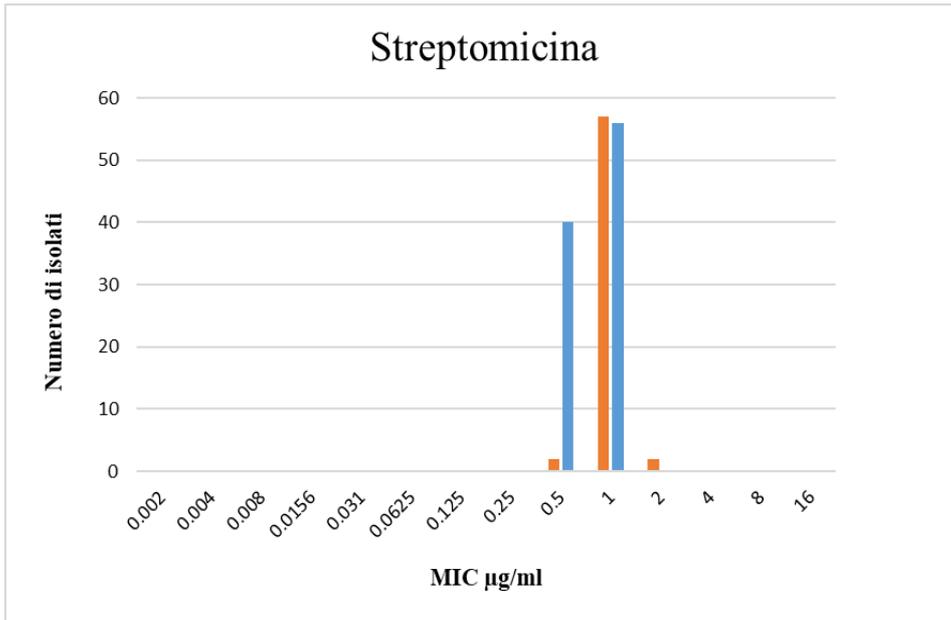


Figura 9.2. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la streptomicina.

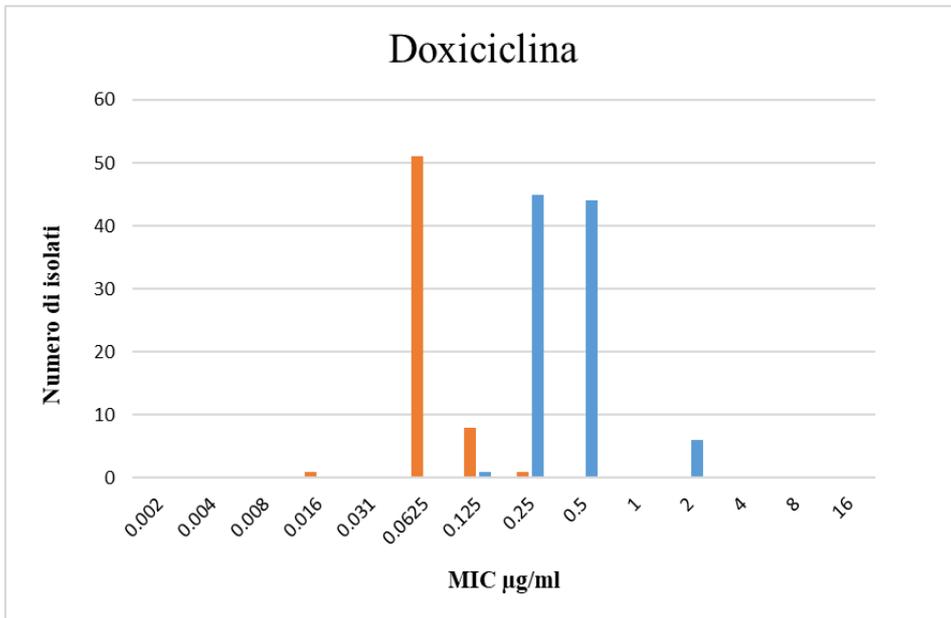


Figura 9.3. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la doxiciclina.

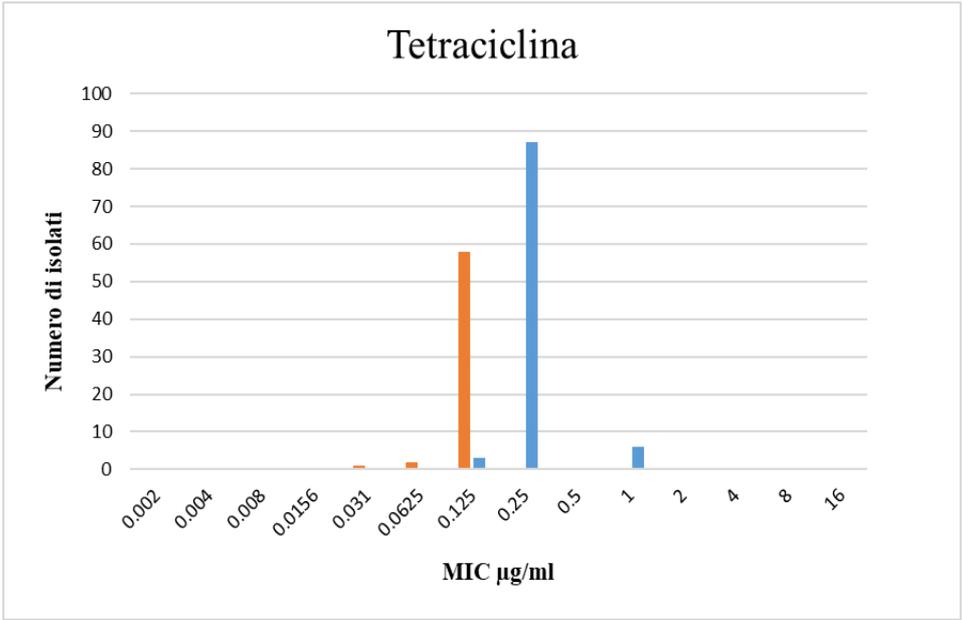


Figura 9.4. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la tetraciclina.

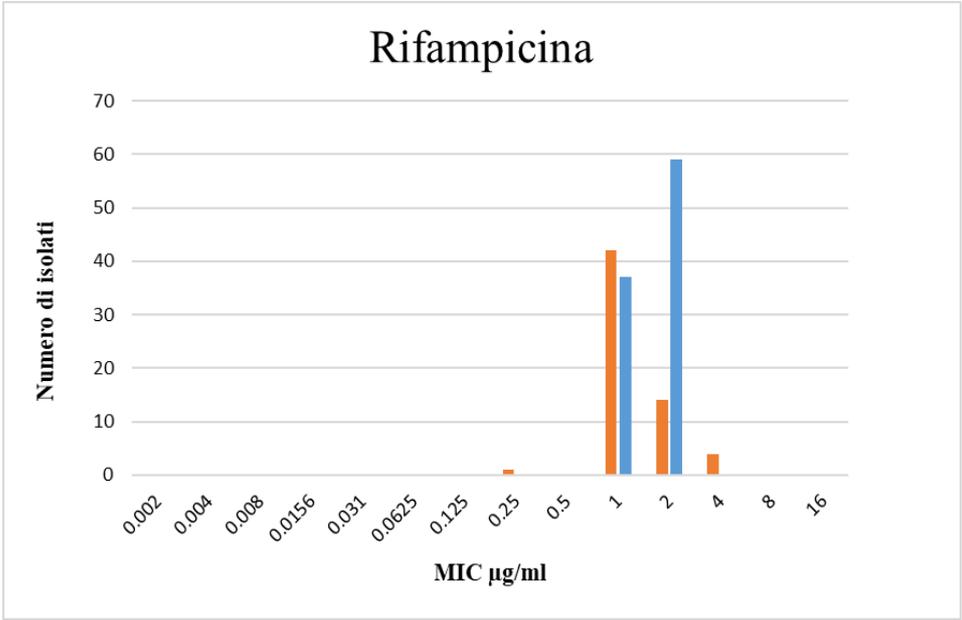


Figura 9.5. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la rifampicina.

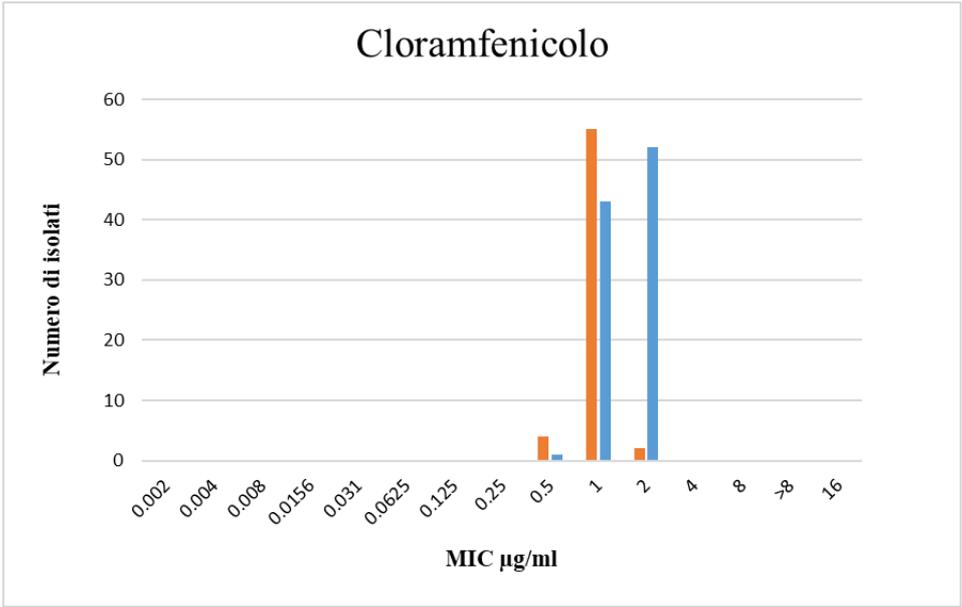


Figura 9.6. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per il cloramfenicolo.

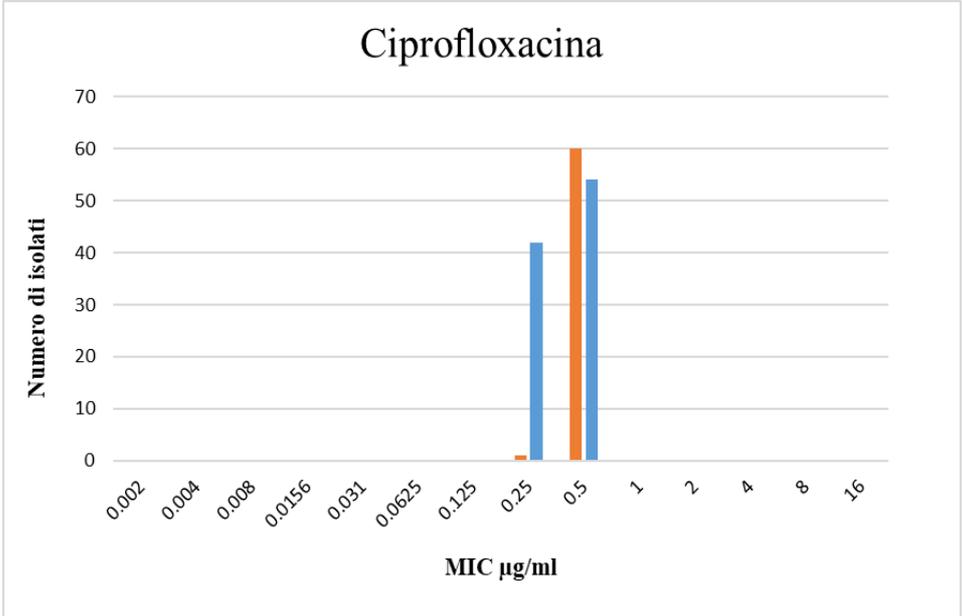


Figura 9.7. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la ciprofloxacina.

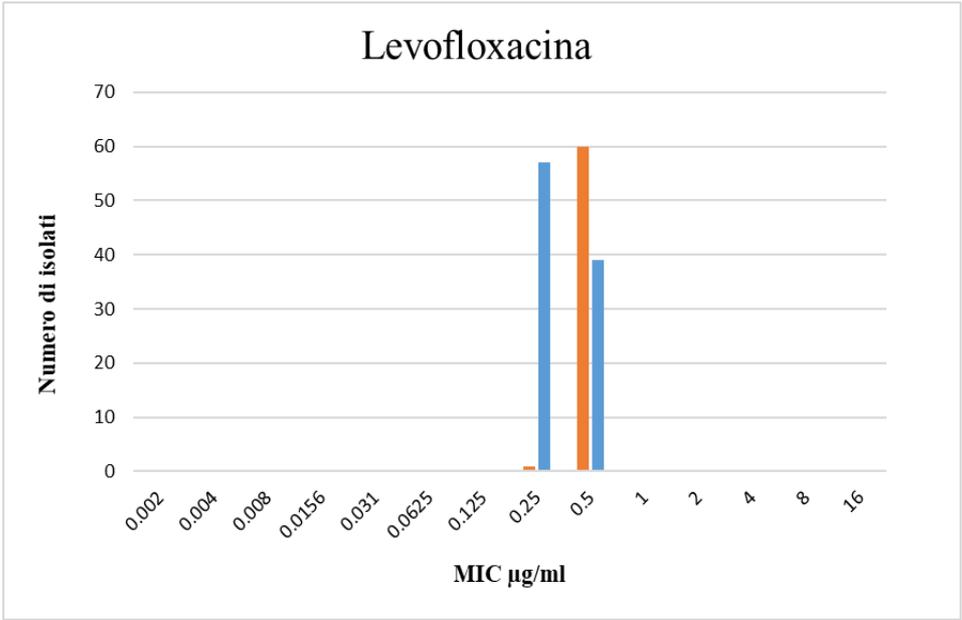


Figura 9.8. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la levofloxacin.

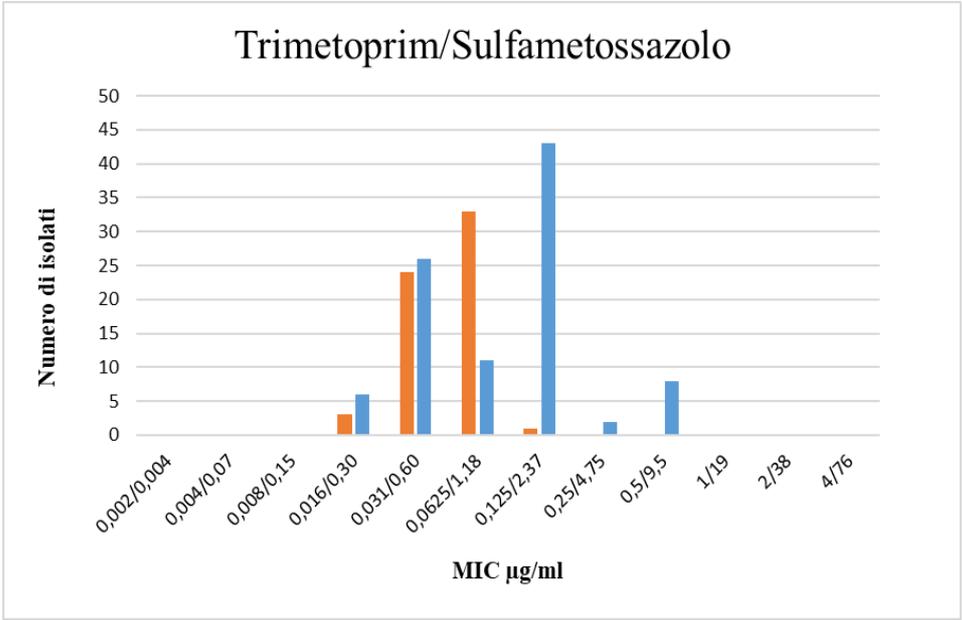


Figura 9.9. Distribuzione dei valori di MIC ottenuti per la combinazione trimetoprim/sulfametossazolo.

Prendendo in considerazione i ceppi batterici che si rendono più frequentemente responsabili di brucellosi negli animali da allevamento, i risultati mostrano per le specie *B. abortus* e *B. melitensis*, una suscettibilità differente per alcuni antibiotici e più simile per altri.

Per la famiglia degli aminoglicosidi, della quale sono stati testati gentamicina (*Figura 9.1*) e streptomina (*Figura 9.2*), si osserva una concordanza nei valori di MIC ottenuti per la maggior parte dei ceppi di *B. abortus* e *B. melitensis* studiati.

Nel caso della gentamicina, la quasi totalità degli isolati di *B. melitensis* presenta una MIC= 0.25 µg/ml; si rileva un solo valore outlier (MIC= 0.125 µg/ml) relativo al ceppo vaccinale REV1 isolato da un ovino.

Lo stesso valore di MIC= 0.25 µg/ml è stato riscontrato per 76 dei 96 ceppi di *B. abortus* testati; 19 ceppi di *B. abortus* mostrano MIC più elevata (MIC= 0.5 µg/ml) e un solo ceppo presenta un valore inferiore (MIC= 0.125 µg/ml).

Focalizzando l'attenzione sui biovar, si osserva che tutti i ceppi di *B. abortus* bv.1 sono inibiti da una stessa concentrazione di antibiotico pari a 0.25 µg/ml; i ceppi di *B. abortus* bv.3 sono inibiti alcuni (24/42) da una concentrazione di 0.25 µg/ml e altri (18/42) da una concentrazione di 0.5 µg/ml.

Per la streptomina la situazione è analoga: gli isolati di *B. melitensis*, ad eccezione di 4 campioni, mostrano un valore di MIC= 1 µg/ml. La stessa MIC

è stata riscontrata per tutti i ceppi di *B. abortus* bv.3 testati e per un piccolo gruppo di ceppi di *B. abortus* bv.1 mentre la maggior parte di questi sono inibiti da una concentrazione inferiore (MIC= 0.5 µg/ml).

Le minime concentrazioni inibenti riscontrate per i due antibiotici aminoglicosidici testati risultano nettamente inferiori ai valori di *breakpoint* di sensibilità, sottolineando una piena suscettibilità dei ceppi nei confronti delle stesse molecole antimicrobiche.

Analizzando i grafici relativi agli antibiotici della classe delle tetracicline, quali doxiciclina (*Figura 9.3*) e tetraciclina (*Figura 9.4*), si osservano valori di MIC più elevati per gli isolati di *B. abortus* rispetto ai valori ottenuti per gli isolati di *B. melitensis*. I ceppi di *B. melitensis* vengono inibiti da una concentrazione di doxiciclina pari 0.0625 µg/ml e di tetraciclina uguale a 0.125 µg/ml; 8 ceppi richiedono una concentrazione di doxiciclina superiore per l'inibizione (MIC= 0.125 µg/ml). Qualche ceppo mostra dei valori outlier: tra questi è compreso il ceppo vaccinale REV1.

La quasi totalità degli isolati di *B. abortus* considerati (87/93) presenta una MIC= 0.25 µg/ml per la tetraciclina; solo 6 isolati mostrano una MIC superiore e 3 una MIC inferiore.

E' interessante osservare che per i ceppi di *B. abortus*, in relazione alla suscettibilità per la doxiciclina, è possibile fare una netta distinzione in

funzione del biovar: in tal caso infatti, tutti i ceppi di *B. abortus* bv.3 considerati sono inibiti da concentrazioni di farmaco inferiori (MIC= 0.25 µg/ml) rispetto a quelle necessarie per l'inibizione degli isolati di biovar 1 che richiedono concentrazioni di 0.5 µg/ml e 2 µg/ml.

I valori di minima concentrazione inibitoria riportati per le tetracicline risultano vicini ai valori soglia di suscettibilità e, per alcuni ceppi, sono stati documentati valori al limite o oltre la sensibilità. E' il caso di 6 ceppi di *B. abortus* bv.1, isolati da bufali ed un bovino della provincia di Caserta, che mostrano per la doxiciclina MIC= 2 µg/ml, risultando quindi non sensibili al farmaco, e per la tetraciclina MIC= 1 µg/ml, ovvero sulla soglia della sensibilità.

Per gli antibiotici rifampicina (*Figura 9.5*) e cloramfenicolo (*Figura 9.6*), aventi meccanismo d'azione differente, gli istogrammi evidenziano una distribuzione dei valori di MIC spostata verso destra, dunque verso valori più alti.

Per la rifampicina si osserva una distinzione netta circa le concentrazioni di antibiotico richieste per l'inibizione di *B. abortus* bv. 1 e bv.3, che risultano rispettivamente di 2 µg/ml e 1 µg/ml.

Riguardo ai ceppi di *B. melitensis*, i dati suggeriscono che più della metà dei ceppi viene inibita da una concentrazione di rifampicina di 1 µg/ml; i restanti

richiedono invece una o due concentrazioni maggiori di farmaco, evidenziando un'evoluzione verso la resistenza alla molecola antibiotica in questione.

Per il cloramfenicolo si rileva concordanza nei valori di MIC riscontrati per gli isolati di *B. melitensis* e solo pochi ceppi mostrano valori differenti. Gli isolati di *B. abortus* possono essere distinti in due gruppi, indipendentemente dal biovar, aventi MIC pari a 1 µg/ml e 2 µg/ml. Relativamente a questo antibiotico, i valori di MIC ottenuti risultano molto vicini al *breakpoint* della sensibilità; non si riscontrano tuttavia isolati aventi suscettibilità intermedia o resistenza al farmaco.

Discorso diverso va fatto invece per la rifampicina per la quale è stata accertata la presenza di isolati di *B. abortus* e *B. melitensis* con fenotipo intermedio o resistente al farmaco.

Relativamente alla classe dei fluorochinoloni, sono stati testati gli antibiotici ciprofloxacina (*Figura 9.7*) e levofloxacina (*Figura 9.8*).

Per entrambe le molecole antibiotiche, i ceppi di *B. melitensis* mostrano valori di minima concentrazione inibente pari a 0.5 µg/ml e il solo valore outlier, avente MIC= 0.25 µg/ml, è riconducibile al ceppo vaccinale REV1. Gli isolati di *B. abortus* hanno invece valori di MIC variabili tra 0.5 µg/ml e 0.25 µg/ml. Nello specifico, per la ciprofloxacina, si osserva che la totalità dei ceppi di *B. abortus* bv.1 viene inibita da una concentrazione di farmaco pari a

0.5 µg/ml; i ceppi di *B. abortus* bv.3 sono inibiti da una concentrazione inferiore, uguale a 0.25 µg/ml. Tale distinzione a livello di biovar non risulta altrettanto netta per la levofloxacin: si rileva comunque che la gran parte (38/54) dei ceppi di *B. abortus* bv.1 ha MIC= 0.5 µg/ml e solo un piccolo gruppo (16/54) ha MIC inferiore. La totalità degli isolati di *B. abortus* bv.3 presenta per la levofloxacin lo stesso valore di minima concentrazione inibitoria rilevato per la ciprofloxacina, ovvero 0.25 µg/ml.

Tutti i ceppi risultano suscettibili agli antibiotici fluorochinolonici presi in considerazione; inoltre, le MIC registrate si attestano al di sotto del *breakpoint* di sensibilità di una o due concentrazioni.

Per quanto concerne la combinazione di antibiotici testata, costituita da trimetoprim e sulfametossazolo (*Figura 9.9*) in rapporto 1:19, si riscontra una grande variabilità nelle suscettibilità dei ceppi di *B. melitensis* e, ancora più marcata per i ceppi di *B. abortus*. Facendo una media ponderata dei valori di MIC ottenuti per le due specie, si ottiene un valore di 0.12 µg/ml per *B. abortus* e 0.048 µg/ml per *B. melitensis*. Entrambi i valori medi risultano di molto inferiori al valore soglia definito dal CLSI per la combinazione antibiotica in questione.

Nel grafico sottostante (*Figura 10*) sono riportati i valori di minima concentrazione inibente ottenuti per i ceppi di *Brucella spp.* responsabili di infezioni negli animali d'affezione e nella fauna selvatica.

E' necessario precisare che i quattro ceppi di *B. suis* e i due ceppi di *B. canis* inclusi nello studio hanno mostrato rispettivamente identici profili di suscettibilità agli antibiotici.

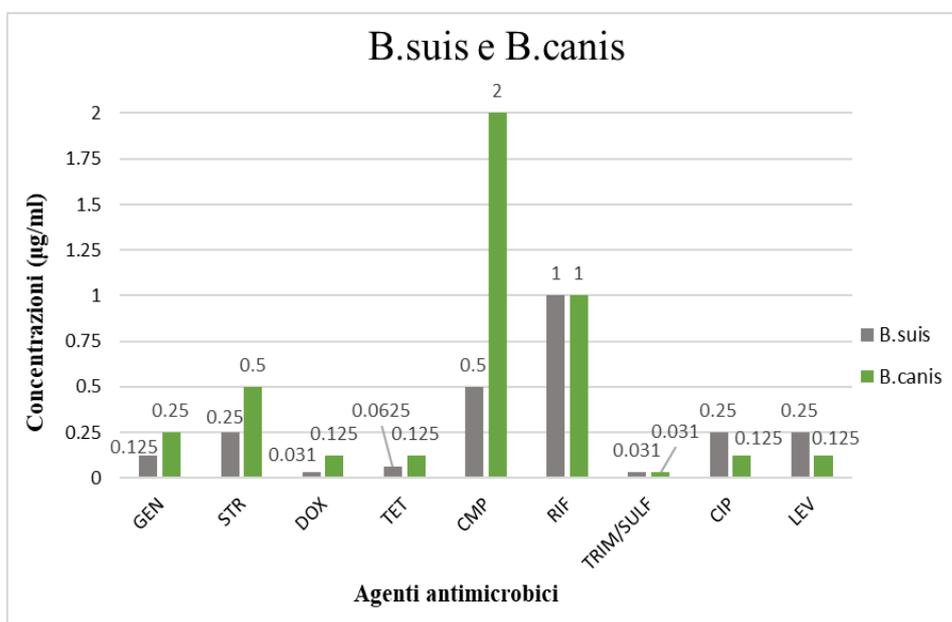


Figura 10 Profili di sensibilità agli antimicrobici dei ceppi di *B. suis* (n=4) e *B. canis* (n=2) testati.

Per i ceppi di *B. suis* si osserva una maggiore suscettibilità nei confronti degli antimicrobici in esame: in particolare, per gentamicina, streptomina, doxiciclina, tetraciclina e cloramfenicolo si registrano valori di MIC inferiori

in genere di una o due concentrazioni rispetto a quelle osservate per gli isolati di *B. abortus* e *B. melitensis*.

Le MIC definite per i restanti antibiotici quali rifampicina, ciprofloxacina, levofloxacina e per la combinazione trimetoprim/sulfametossazolo risultano in linea con quelle mostrate per i ceppi responsabili di brucellosi bovina ed ovicaprina.

Da questi dati si evince una maggiore suscettibilità nei confronti di alcuni degli antibiotici testati, dei ceppi di *Brucella* isolati da animali selvatici rispetto ai ceppi isolati da animali da allevamento.

Gli isolati di *B. canis* mostrano profili di sensibilità paragonabili a quelli dei ceppi di *B. abortus* e *B. melitensis*, ad eccezione degli antimicrobici ciprofloxacina e levofloxacina per cui si riscontrano valori di minima concentrazione inibente inferiori.

In aggiunta ai ceppi di *Brucella spp.*, sono stati sottoposti a test di suscettibilità agli antimicrobici due isolati di *Ochrobactrum anthropi* (Figura 11), patogeno ambientale appartenente alla famiglia delle *Brucellaceae*.

La crescita degli isolati è stata inibita da alcuni antibiotici ma non da altri come la streptomina; cloramfenicolo e rifampicina riescono ad inibirne la proliferazione solo ad alte concentrazioni. Per la combinazione trimetoprim/sulfametossazolo i risultati appaiono discordanti.

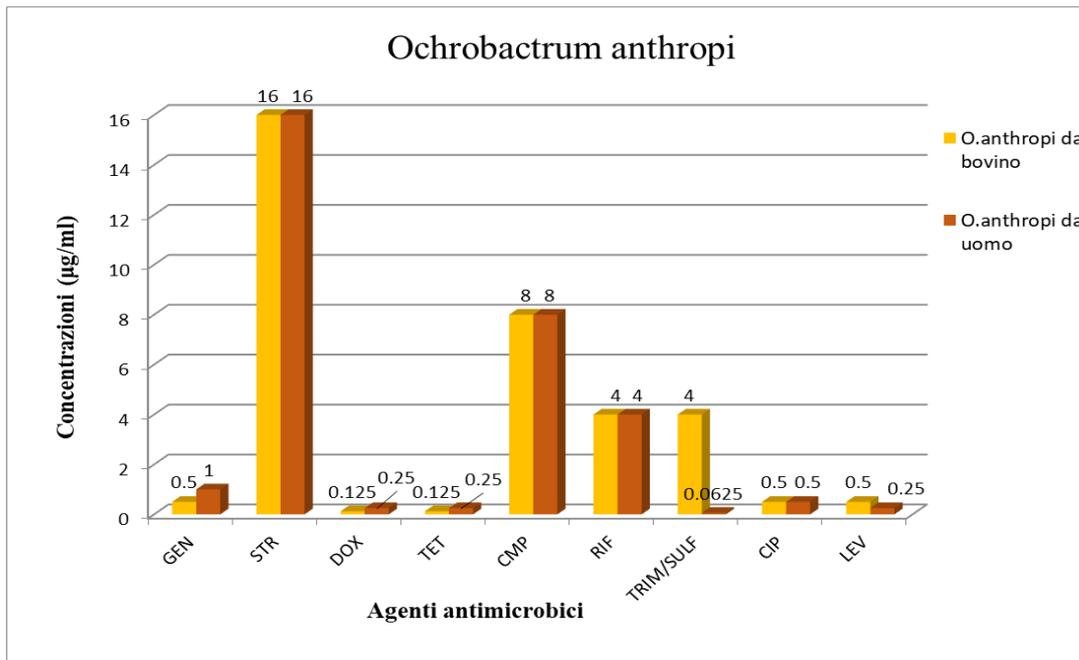


Figura 11. Profili di sensibilità agli antimicrobici degli isolati di *Ochrobactrum anthropi*.

5.3 Parametri test di microdiluzione in brodo

Le letture in assorbanza delle micropiastre hanno permesso di confermare la lettura visiva delle minime concentrazioni inibenti (MIC).

Per l'interpretazione delle stesse è stato utilizzato un valore di cut-off di 0.30:

- Pozzetti con $A < 0.30$ = non presentano crescita batterica
- Pozzetti con $A > 0.30$ = è presente crescita batterica.

Il conteggio delle unità formanti colonie su piastra è stato effettuato per avere conferma della concentrazione dell'inoculo preparato per l'allestimento delle micropiastre. I valori di ufc/ml ottenuti risultano compresi tra 50 e 150 e corrispondenti ad una concentrazione di 10^4 ufc/ml.

5.4 Determinazione dei tassi di prevalenza delle resistenze antimicrobiche

Nella tabella che segue è riportato il numero di isolati sensibili, intermedi, resistenti e non-suscettibili agli antimicrobici testati (Tabella 11).

	Rifampicina			Cloramfenicolo			Doxiciclina	
	S	I	R	S	I	R	S	NS
<i>B.abortus</i>	37	59	0	96	0	0	90	6
<i>B.melitensis</i>	43	14	4	61	0	0	61	0
<i>B.suis</i>	4	0	0	4	0	0	4	0
<i>B.canis</i>	2	0	0	2	0	0	2	0
<i>Ochrobactrum</i>	0	0	2	0	0	2	2	0

	Tetraciclina		Gentamicina		Streptomicina	
	S	NS	S	NS	S	NS
<i>B.abortus</i>	96	0	96	0	96	0
<i>B.melitensis</i>	61	0	61	0	61	0
<i>B.suis</i>	4	0	4	0	4	0
<i>B.canis</i>	2	0	2	0	2	0
<i>Ochrobactrum</i>	2	0	2	0	0	2

	Ciprofloxacina		Levofloxacina		Trimetoprim/Sulfametossazolo	
	S	NS	S	NS	S	NS
<i>B.abortus</i>	96	0	96	0	96	0
<i>B.melitensis</i>	61	0	61	0	61	0
<i>B.suis</i>	4	0	4	0	4	0
<i>B.canis</i>	2	0	2	0	2	0
<i>Ochrobactrum</i>	2	0	2	0	1	1

Tabella 11. Numero di isolati sensibili (S), intermedi (I), resistenti (R), non-suscettibili (NS) agli antimicrobici testati.

La maggior parte degli isolati di *Brucella spp.* analizzati (86/163) risulta suscettibile a tutti gli antibiotici testati. Il resto degli isolati appare resistente o non-suscettibile alla rifampicina o alla doxiciclina.

Nello specifico, i risultati ottenuti evidenziano la presenza di quattro ceppi di *B. melitensis* bv.3, isolati da bovini e ovini, resistenti alla rifampicina.

Una suscettibilità intermedia alla rifampicina è stata rilevata in 73/163 isolati, riconducibili 59 alla specie *B. melitensis* e 14 alla specie *B. abortus*; sei di questi isolati, tutti identificati come *B. abortus* bv.1, risultano anche non-suscettibili alla doxiciclina.

Si riscontra pertanto una non-suscettibilità alla doxiciclina per il 3,6% degli isolati; per la rifampicina, il 2,4% degli isolati viene classificato come resistente e il 44,8% presenta una sensibilità intermedia.

Gli isolati di *Ochrobactrum anthropi* sono indicati come resistenti alla rifampicina e al cloramfenicolo e non-suscettibili alla streptomicina. In relazione alla combinazione antibiotica trimetoprim/sulfametossazolo, il ceppo isolato da bovino risulta non suscettibile al contrario del ceppo isolato dall'uomo. Gli stessi mostrano sensibilità per le tetracicline, la gentamicina e i flurochinoloni.

6. DISCUSSIONE

La brucellosi è un'importante malattia zoonotica diffusa a livello mondiale e presente con elevata incidenza nelle regioni del Mediterraneo e del Medio Oriente. Sebbene siano stati compiuti progressi nel controllo della malattia, essa rimane ancora oggi una grave minaccia per la salute pubblica e per l'economia di molti paesi.

In Italia, le province centro-settentrionali sono state dichiarate ufficialmente indenni da brucellosi bovina ed ovi-caprina. Differentemente, tale zoonosi risulta difficile da eradicare nelle regioni meridionali: il ricorso a politiche veterinarie mirate come lo *stamping-out*, in sostituzione alla pratica della vaccinazione, eseguita in passato e rivelatasi inefficace, ha permesso di ridurre i tassi di prevalenza della brucellosi sul territorio italiano.

Permangono tuttavia delle aree che fungono da hotspot per la brucellosi animale e si rendono responsabili della ricomparsa della malattia in territori adiacenti dichiarati indenni.

Nell'uomo, l'infezione da *Brucella spp.* richiede particolare attenzione relativamente alla diagnosi, spesso tardiva, al rischio di cronicizzazione della malattia e al trattamento, la cui efficacia rischia di essere compromessa dall'emergere di resistenze antimicrobiche.

Il lavoro di tesi svolto si colloca nell'ambito di un Progetto di ricerca Europeo volto ad investigare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza nel genere batterico *Brucella spp.* e rappresenta il primo studio condotto sul territorio italiano, finalizzato a determinare i livelli di resistenza antimicrobica (AMR, *antimicrobial resistance*) nei ceppi di *Brucella* circolanti in Italia.

A tal fine sono stati selezionati e testati isolati umani, riconducibili alla specie *B. melitensis*, e veterinari, appartenenti a diverse specie del genere *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*). Gli isolati veterinari provenivano da animali da allevamento, animali da compagnia e fauna selvatica.

La selezione ha rappresentato i tre principali hotspot di brucellosi sul territorio italiano che si collocano rispettivamente nella parte Nord-Orientale della Sicilia (Catania-Messina-Enna), in Campania con particolare riferimento al territorio casertano e nel Nord della Puglia relativamente alla provincia di Foggia. In particolare, se per le ultime due l'epidemiologia della zoonosi appare ben definita, ovvero con una prevalenza di brucellosi bufalina da *B. abortus* bv.1 per la Campania e brucellosi bovina da *B. abortus* bv.3 per la Puglia, al contrario in Sicilia si nota una presenza concomitante di brucellosi ovi-caprina, sostenuta da *B. melitensis* bv.3, e, in misura minore, di brucellosi bovina, causata da *B. abortus* bv.3.

Coerentemente a quanto osservato, gli stessi territori sono ad oggi ancora dichiarati non-ufficialmente indenni da brucellosi ovi-caprina e bovina.

L'analisi dei profili di suscettibilità agli antimicrobici effettuata sugli isolati considerati, ha permesso di evidenziare la presenza di ceppi pienamente sensibili a tutti gli antimicrobici testati e ceppi che, diversamente, mostrano resistenze/non-suscettibilità nei confronti di doxiciclina o rifampicina, entrambi impiegati in ambito clinico per il trattamento della brucellosi nell'uomo.

Le resistenze/non-suscettibilità osservate interessano nello specifico i ceppi batterici delle specie *B. abortus* e *B. melitensis* isolati da bestiame domestico (bufali, bovini, ovi-caprini) mentre non sono state riscontrate nei ceppi di *B. suis* bv.2, isolati da cinghiali selvatici, e nei ceppi di *B. canis*, isolati da animali da compagnia. In particolare, dai dati raccolti emerge che:

- Il fenotipo resistente (R) alla rifampicina si riscontra esclusivamente in ceppi della specie *B. melitensis* isolati da ovini e bovini;
- Il fenotipo intermedio (I) alla rifampicina si rileva in ceppi delle specie *B. melitensis* e *B. abortus* isolati da bufali, bovini ed ovi-caprini;

- La non-suscettibilità alla doxiciclina (NS) è presente esclusivamente in ceppi della specie *B. abortus* bv.3 isolati da bufali; gli stessi risultano avere anche un fenotipo intermedio per la rifampicina.

Essendo il fenomeno dell'antibiotico-resistenza scarsamente studiato nel genere batterico *Brucella spp.*, risulta difficile confrontare i tassi di prevalenza delle resistenze osservate sul territorio italiano con quelli di altri paesi. I pochi lavori disponibili in letteratura descrivono studi condotti in Brasile e Corea esclusivamente su ceppi della specie *B. abortus* isolati dal bestiame: in entrambi i casi viene evidenziata la presenza di isolati con fenotipo resistente (R) e intermedio (I) nei confronti della rifampicina mentre non viene riscontrata la non-suscettibilità (NS) alla doxiciclina, diversamente dagli isolati italiani. Relativamente alla rifampicina, in Brasile si osserva un fenotipo resistente (R) per il 2% degli isolati e un fenotipo intermedio (I) per il 36,7% dei ceppi; in merito alla Corea, i tassi riportati sono del 4,7% per il fenotipo resistente (R) e del 73,3% per il fenotipo intermedio (Trott *et al.*, 2018).

Considerando invece gli isolati italiani di *B. abortus* testati nel corso del lavoro svolto, emerge che il 61,45% di essi presenta un fenotipo intermedio (I) alla rifampicina; differentemente, per questa specie di *Brucella* e relativamente a questo antimicrobico, non si rilevano fenotipi resistenti.

Dal confronto risulta evidente che, nei due paesi considerati, Brasile e Corea, così come in Italia, la piena resistenza alla rifampicina sia stata riscontrata in una percentuale molto bassa (< 5%) di ceppi di *B. abortus* circolanti. Al contrario, la larga diffusione del fenotipo intermedio lascia presupporre che stiano emergendo meccanismi di resistenza verso questo antimicrobico.

Nei Paesi Europei la diffusione della resistenza antimicrobica nei ceppi di *Brucella* non è mai stata investigata. Il Portogallo risulta impegnato, analogamente all'IZSAM per il territorio italiano, nel progetto di ricerca inerente l'analisi dell'AMR in *Brucella spp.*.

I dati raccolti dallo stato partner del progetto mostrano, relativamente alle specie *B. suis* e *B. melitensis*, profili di sensibilità agli antimicrobici simili a quelli ottenuti per i ceppi italiani (Comunicazione personale). Al contrario, i ceppi di *B. abortus* isolati dal bestiame domestico sul territorio portoghese, se confrontati con i rispettivi isolati italiani, risultano meno sensibili agli antibiotici testati, soprattutto relativamente alle molecole antibiotiche streptomicina, cloramfenicolo, rifampicina, ciprofloxacina e levofloxacina.

La minore sensibilità dei ceppi di *B. abortus* isolati in Portogallo nei confronti di alcune classi di antimicrobici potrebbe esser ricondotta ad un uso cospicuo degli stessi negli allevamenti bovini locali che avrebbe favorito lo sviluppo di meccanismi di resistenza nei ceppi di *Brucella spp.* presenti sul territorio.

Di fatto le regolamentazioni relative all'uso di antibiotici in veterinaria variano tra gli stati membri dell'UE e ciò spiegherebbe una diversa sensibilità agli antimicrobici di ceppi batterici della stessa specie isolati in nazioni differenti.

I meccanismi genetici alla base delle resistenze alla doxiciclina e alla rifampicina osservate in questo studio restano ancora ignoti. Conoscendo tuttavia lo stile di vita intracellulare facoltativo della *Brucella*, si potrebbe pensare che la resistenza agli antibiotici sia dovuta a mutazioni spontanee o multiple verificatesi sul genoma batterico piuttosto che all'acquisizione di determinanti di resistenza attraverso scambio orizzontale di materiale genetico: eventi di trasferimento genico orizzontale (*HGT, horizontal gene transfer*) non sono mai stati documentati nel genere batterico *Brucella*.

In tale contesto, il lavoro di tesi condotto si configura come uno studio preliminare e pone le basi per ulteriori indagini finalizzate ad individuare i meccanismi delle resistenze antimicrobiche presenti in *Brucella spp.*: un'analisi comparativa delle sequenze genomiche di ceppi che hanno mostrato resistenze/non suscettibilità e di ceppi risultati pienamente sensibili agli antimicrobici testati, potrebbe portare all'identificazione di mutazioni correlabili alle resistenze rilevate.

Situazione diversa viene riscontrata invece in *Ochrobactrum spp.* : gli isolati di *Ochrobactrum anthropi* studiati hanno mostrato resistenza nei confronti di un maggior numero di antibiotici testati (streptomina, cloramfenicolo, rifampicina, trimetoprim/sulfametossazolo). *Ochrobactrum spp.* viene descritto come un patogeno ambientale ed opportunista, strettamente imparentato con *Brucella spp.* e generalmente isolato da un'ampia varietà di ambienti tra cui acqua, suolo, piante ed animali (Moreno *et al.*, 2022). A differenza di *Brucella*, questo microrganismo riesce più facilmente a collocarsi in nicchie polimicrobiche che rappresentano di fatto l'ambiente ideale per gli scambi genetici tra ceppi batterici appartenenti a specie o generi differenti. *Ochrobactrum spp.* si configura quindi, coerentemente a quanto osservato dai dati ottenuti, come un patogeno che tende facilmente allo sviluppo di resistenze antimicrobiche: queste resistenze emergono in seguito ad eventi di HGT o attraverso processi di mutazione e selezione dettati dalla pressione selettiva esercitata dagli antimicrobici e dai composti tossici diffusi nell'ambiente e con cui i microrganismi vengono a contatto.

In relazione ai quattro isolati umani di *B. melitensis* inclusi nello studio, dai dati ottenuti è emerso che tre di essi risultano sensibili a tutti gli antibiotici testati; uno solo presenta per la rifampicina una non piena suscettibilità, ovvero un fenotipo intermedio (I). Il ridotto numero di campioni considerati rispecchia

la bassa incidenza della brucellosi umana sul territorio nazionale e non permette in tal caso di determinare in maniera statisticamente significativa i tassi di prevalenza delle resistenze antimicrobiche nei campioni clinici di *Brucella*.

L'identificazione di ceppi di *Brucella* resistenti o non pienamente sensibili ad alcuni antimicrobici pone particolare attenzione relativamente al rischio di trasmissione degli stessi all'uomo che porterebbe all'insorgenza di infezioni difficili da contrastare con le terapie antibiotiche normalmente utilizzate.

Il percorso terapeutico definito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 1986 prevede l'uso di doxiciclina per sei settimane, in combinazione con rifampicina per sei settimane o streptomicina per 2-3 settimane. Il trattamento antibiotico risulta indispensabile per la cura della brucellosi umana ma non esente da inconvenienti quali:

- la necessità della somministrazione parenterale di streptomicina che richiede pertanto una rete sanitaria adeguata per il trattamento ambulatoriale o il ricovero prolungato;
- l'insufficiente conoscenza degli effetti collaterali dei regimi terapeutici proposti;
- il pericolo di sviluppo di resistenze a causa dei trattamenti prolungati;

- la mancata adesione del paziente al trattamento (essendo la risoluzione dei sintomi rapida, il paziente tende ad interrompere il trattamento senza portarlo a termine);
- l'elevata probabilità di comparsa delle recidive (circa il 10%).

Nel corso degli anni gli studi condotti non sembrano aver fornito prove sufficienti per la determinazione di un approccio terapeutico alternativo. D'altra parte l'efficacia dell'unico trattamento antibiotico disponibile per la cura della brucellosi umana appare compromesso dall'emergenza delle resistenze. In tale contesto, il contrasto dell'AMR risulta fondamentale per perseverare la capacità di trattare efficacemente l'infezione da *Brucella spp.* nell'uomo. In mancanza di interventi concreti, la brucellosi andrebbe a classificarsi negli anni a venire come un'infezione non curabile e ciò porterebbe il più delle volte ad una cronicizzazione della malattia con conseguente compromissione dello stile di vita dei pazienti oltre che alla necessità di cure più intensive e costose.

Appare ormai evidente che il fenomeno dell'antibiotico-resistenza risulta trasversale a qualsiasi genere batterico e sembra sfuggire ad ogni tentativo di controllo. Le ripercussioni sulla salute umana risultano inevitabili e le prospettive future non sono incoraggianti.

Nell'ambito dei programmi di eradicazione della brucellosi attuati a livello nazionale, l'applicazione di misure più restrittive rimane al momento l'unica strategia applicabile per ridurre la prevalenza della malattia negli animali e conseguentemente il rischio di insorgenza di brucellosi sostenuta da ceppi antibiotico-resistenti nell'uomo.

In un'ottica One Health che considera in modo integrato la salute dell'uomo, degli animali e dell'ambiente e promuove la cooperazione tra discipline diverse e diversi settori di ricerca, un costante monitoraggio delle resistenze antimicrobiche nei ceppi di *Brucella* circolanti sul territorio nazionale potrebbe rivelarsi un valido approccio per valutare negli anni l'evoluzione delle resistenze osservate.

BIBLIOGRAFIA

- Ariza J., Bosch J., Gudiol F., Liñares J., Viladrich P.F., Martín R. (1986). *Relevance of in vitro antimicrobial susceptibility of Brucella melitensis to relapse rate in human brucellosis*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 30(6), 958-960.
- Ariza J., Bosilkovski M., Cascio A., Colmenero J. D., Michael J., Corbel M.J. et al. (2007). *Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations*. PLoS Medicine, 4(12), e317.
- Blair J.M., Richmond G.E., Piddock L.J. (2014). *Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance*. Future Microbiology, 9(10), 1165-1177.
- Calistri P., Iannetti S., Atzeni M., Di Bella C., Schembri P., Giovannini A. (2013). *Risk factors for the persistence of bovine brucellosis in Sicily from 2008 to 2010*. Preventive Veterinary Medicine, 110(3), 329–334.
- Carattoli A. (2001). *Importance of integrons in the diffusion of resistance*. Veterinary Research, 32(3/4), 243-259.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard - Ninth edition*. Vol.32 N.2.
- Corbel M.J. (2006). *Brucellosis in Humans and Animals*. World Health Organization (WHO). Documento accessibile all'indirizzo: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43597> (consultato il 28 Giugno 2022).
- Dadar M., Shahali Y., Whatmore A.M. (2019). *Human brucellosis caused by raw dairy products: a review on the occurrence, major risk factors and prevention*. International Journal of Food Microbiology, 292, 39–47.
- Davies J, Davies D. (2010). *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74(3), 417-433.

De Angelis G., Del Giacomo P., Posteraro B., Sanguinetti M., Tumbarello M. (2020). *Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae*. International Journal of Molecular Sciences, 21(14), 5090.

De Massis F., Zilli K., Di Donato G., Nuvoloni R., Pelini S. *et al.* (2019). *Distribution of Brucella field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015*. PLoS One, 14(3), e0213689.

Decisione di esecuzione (UE) 2021/385 della Commissione del 2 marzo 2021 che modifica l'allegato II della decisione 93/52/CEE per quanto riguarda la qualifica di ufficialmente indenni da brucellosi (*B. melitensis*), gli allegati I e II della decisione 2003/467/CE per quanto riguarda la qualifica di ufficialmente indenni da tubercolosi e brucellosi e gli allegati I e II della decisione 2008/185/CE per quanto riguarda la qualifica di indenni e il riconoscimento dei programmi di eradicazione della malattia di Aujeszky di alcune regioni [notificata con il numero C (2021)1064].

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2021). *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*. EFSA Journal, 9(12), e0697.

Facciolà A, Palamara MAR, D'Andrea G, Marano F, Magliarditi D *et al.* (2018). *Brucellosis is a public health problem in southern Italy: burden and epidemiological trend of human and animal disease*. Journal of Infection and Public Health, 11(6), 861-866.

Garofolo G, Di Giannatale E, Platone I, Zilli K, Sacchini L, Abass A, *et al.* (2017). *Origins and global context of Brucella abortus in Italy*. BMC Microbiology, 17, 28.

Godfroid J., Cloeckaert A., Liautard J-P, Kohler S., Fretin D., Walravens K., Garin-Bastuji B., Letesson J-J. (2005). *From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis*. Veterinary Research, 36(3), 313–326.

Guardabassi L., Jensen L.B., Kruse H. (2008). *Guide to antimicrobial use in animals*. Blackwell Publishing.

Heuer H., Smalla K. (2007). *Horizontal gene transfer between bacteria*. Environmental Biosafety Research, 6(1-2), 3-13.

Istituto Superiore di Sanità. (2021). *AR-ISS: Sorveglianza nazionale dell'antibiotico-resistenza. Dati 2020*. Rapporti ISS-Sorveglianza RIS-1/2021. Documento accessibile all'indirizzo: https://www.iss.it/documents/20126/0/RIS-1_2021.pdf/af6da4cc-0f57-3800-68ca-c5f6c05479c0?t=1637230397225 (consultato il 28 Giugno 2022).

Janowicz A.; De Massis F.; Zilli K.; Ancora M.; Tittarelli M.; Sacchini F.; di Giannatale E.; Sahl J.W.; Foster J.T., Garofolo G. (2020). *Evolutionary History and Current Distribution of the West Mediterranean Lineage of Brucella melitensis in Italy*. Microbial Genomics, 6(11), e000446.

Marianelli C., Ciuchini F., Tarantino M., Pasquali P., Adone R. (2004). *Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in Brucella spp.* Journal of Clinical Microbiology, 42(12), 5439-5443.

Marianelli C., Graziani C., Santangelo C., Xibilia M.T., Imbriani A., Amato R., Neri D., Cuccia M., Rinnone S., Di Marco V., Ciuchini F. (2007). *Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of Brucella isolates from humans in Sicily, Italy*. Journal of Clinical Microbiology, 45(9), 2923-2928.

Marshall B.M., Levy S.B. (2011). *Food animals and antimicrobials: impacts on human health*. Clinical Microbiology Reviews, 24(4), 718-733.

McEwen S.A., Collignon P.J. (2018). *Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective*. Microbiology Spectrum, 6(2).

Ministero della Sanità. Decreto del Ministero della Sanità del 27 agosto 1994, n. 651. *Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti bovini*. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 277 del 26 novembre 1994.

Ministero della Sanità. Decreto del Ministero della Sanità del 2 luglio 1992, n. 453. *Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini*. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 276 del 23 novembre 1992.

Moreno E., Blasco J.M., Letesson J.J., Gorvel J.P., Moriyón I. (2022). *Pathogenicity and its implication in taxonomy: the Brucella and Ochrobactrum case*. Pathogens, 11(3), 377.

OECD, ECDC, EFSA, EMA. (2022). *Antimicrobial Resistance in the EU/EEA - A One Health response*. Documento accessibile all'indirizzo: <https://www.oecd.org/health/Antimicrobial-Resistance-in-the-EU-EEA-A-One-Health-Response-March-2022.pdf> (consultato il 28 Giugno 2022).

OIE Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health. (2018). *Chapter 2.1.4. Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis, and B. suis) (Infection with B. abortus, B. melitensis and B. suis)*. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.

Pappas G., Solera J. Akritidis N., Tsianos E. (2005). *New approaches to the antibiotic treatment of brucellosis*. International Journal of Antimicrobial Agents, 26(2), 101–105.

Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. (2006). *The new global map of human brucellosis*. The Lancet Infectious Diseases, 6(2), 91–99.

Ravaioli L. (1954). *Tentativo di differenziazione delle varie specie di Brucella con antibiotici*. Rendiconti Istituto Superiore Sanità, 17(5), 418-433.

Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 sugli additivi destinati all'alimentazione animale. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea: L 268 del 18.10.2003, pag. 29-43.

Schurig G.G., Sriranganathan N., Corbel M.J. (2002). *Brucellosis vaccines: past, present and future*. Veterinary Microbiology, 90(1-4), 479-496.

Schwarz S., Chaslus-Dancla E. (2001). *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*. *Veterinary Research*,32(3/4), 201-225.

Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R. (2001). *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6), 431-437.

Seleem M.N., Boyle S.M., Sriranganathan N. (2010). *Brucellosis: a re-emerging zoonosis*. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4),392-398.

Swann M.M., Baxter K.L., Field H.I., Howie J.W., Lucas I.A.M., Millar E.L.M., Murdoch J.C., Parsons J.H., White E.G. (1969). *Report of the Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. Her Majesty's Stationary Office (HMSO): London, UK.

Trott D.J., Abraham S., Adler B. (2018). *Antimicrobial Resistance in Leptospira, Brucella, and Other Rarely Investigated Veterinary and Zoonotic Pathogens*. *Microbiology Spectrum*, 6(4).

White D.G., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D., McDermott P.F. (2002). *Antimicrobial resistance of foodborne pathogens*. *Microbes and Infection*,4(4), 405-412.

World Health Organization. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. Documento accessibile all'indirizzo: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763> (consultato il 28 Giugno 2022).

Sitografia

Antibiotico-resistenza nel settore umano, Ministero della Salute. Da <https://www.salute.gov.it/portale/antibioticoresistenza/dettaglioContenutiAntibioticoResistenza.jsp?id=5282&area=antibiotico-resistenza&menu=vuoto>. Consultato il 28 Giugno 2022.

Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario (BENV), Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G.Caporale”. Da https://www.izs.it/BENV_NEW/territori-ufficialmente-indenni.html. Consultato il 28 Giugno 2022.

Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Da <https://www.ecdc.europa.eu/en/brucellosis/surveillance/atlas>. Consultato il 28 Giugno 2022.

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo percorso desidero ringraziare tutte le persone che, con il loro supporto, mi hanno accompagnato in questo meraviglioso viaggio.

Un ringraziamento particolare va alla mia relatrice, la Prof.ssa Elena Rocchegiani, per avermi seguita con costanza ed entusiasmo nella stesura di questo elaborato. La sua infinita umanità, disponibilità e i suoi consigli mi hanno permesso di affrontare con serenità la fase più importante del mio percorso accademico.

Ringrazio inoltre il correlatore, Dott. Giuliano Garofolo, per avermi dato la possibilità di svolgere questo particolare ed interessante lavoro di tesi in un contesto giovane e dinamico, che ha permesso di mettermi in gioco e fare un'esperienza non solo formativa ma anche personale che sarà preziosa per il mio futuro.

Un grazie sincero va a tutto il personale del Reparto di Batteriologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo, per avermi accolta con simpatia e gentilezza sin dal primo giorno del mio tirocinio ed avermi supportata nello svolgimento del lavoro fornendomi sempre con estrema prontezza, indicazioni e consigli utili.

In particolare, ringrazio Katuscia per avermi guidata, con pazienza e disponibilità, in ogni singola attività di laboratorio svolta e in ogni fase di questo progetto, dalla definizione del protocollo all'elaborazione dei dati. La ringrazio per avermi trasmesso la passione per la ricerca e per avermi motivato ed incoraggiato di fronte a risultati inaspettati ma soprattutto, per aver creduto in me e nelle mie capacità fin da subito.

Ringrazio di cuore Valentina, per avermi affiancata in questi mesi e aver condiviso ogni sfaccettatura di questo lavoro. Profondamente diverse nel carattere, siamo state una la spalla dell'altra, ci siamo aiutate, confrontate, confidate gioie e preoccupazioni. Abbiamo riso insieme per stemperare la tensione delle giornate più impegnative e delle mattinate interminabili in laboratorio. Sei stata una collega di lavoro stupenda e un'amica dolce e leale.

Ringrazio poi Anna, sempre pronta ad aiutarmi di fronte ad ogni mia difficoltà. Grazie per i preziosi consigli e per l'immenso affetto mostratomi.

Ringrazio Daniela, amica dalla triennale, per avermi supportata in tutto il percorso universitario. Fonte di saggezza e razionalità, ha saputo incoraggiarmi nei momenti d'ansia pre-esame e ha gioito con me per ogni risultato raggiunto.

Ringrazio immensamente Elisa, amica sincera e fedele compagna di studi, è stata per me il braccio destro su cui poter sempre contare. Mi ha accompagnata in questi anni, condividendo ogni ora di lezione ed ogni giornata di studio. Non c'è stato esame della magistrale che io abbia fatto senza di lei, ha creduto in me anche quando temevo di non farcela. Ci siamo incontrate in un momento in cui entrambe avevamo bisogno di un punto di riferimento vero e sincero; da allora ci siamo sempre supportate e sappiamo bene che è stato proprio questo il nostro punto di forza. Non so chi ringraziare per avermi dato l'opportunità di conoscerti ma non smetterò mai di farlo. Sono certa che qualsiasi cosa ci riserverà il futuro, troveremo ancora gioie e angosce da condividere.

Ringrazio Matteo, al mio fianco da anni, per aver sopportato il lato peggiore di me, le mie preoccupazioni e i miei timori. Grazie per la tua infinita pazienza, per la tua presenza costante e il tuo amore incondizionato. Grazie per aver festeggiato ogni mia vittoria e per esser riuscito a strapparmi i migliori sorrisi nei momenti più bui.

Il ringraziamento più importante va ai miei genitori, per avermi permesso di intraprendere questo percorso e raggiungere un meraviglioso traguardo. Mi avete cresciuta con amore, educazione e rispetto, appoggiando sempre ogni mia scelta.

Ringrazio mia mamma per avermi trasmesso la dedizione allo studio e la determinazione nel raggiungere gli obiettivi prefissati. Grazie per avermi sostenuta e tranquillizzata nei momenti di sconforto, come solo una mamma sa fare. Ringrazio mio padre, il cui orgoglio per i figli trapela silenziosamente dai suoi occhi. Grazie per avermi mostrato sempre un immenso affetto, non con le parole ma con i fatti.

Ringrazio mio fratello Stefano per i suoi abbracci calorosi e i suoi sorrisi spensierati. Grazie per l'amore fraterno che da sempre ci lega. A te che sei ormai grande e maturo auguro di realizzare tutti i tuoi sogni.

Infine ringrazio la mia amata nonna Santina per i saggi consigli che mi hanno accompagnata in questi anni di studio.

Grazie!

Martina