




 *Campylobacter*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

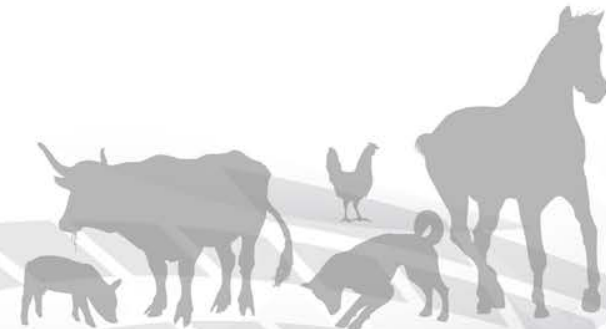
**Valutazione della diffusione dell'antibiotico resistenza in ambiente  
avicolo attraverso un approccio metagenomico**

**Di Giannatale Elisabetta  
IZSA&M- CIFIV Teramo 13/12/2017**



# Resistenza batterica

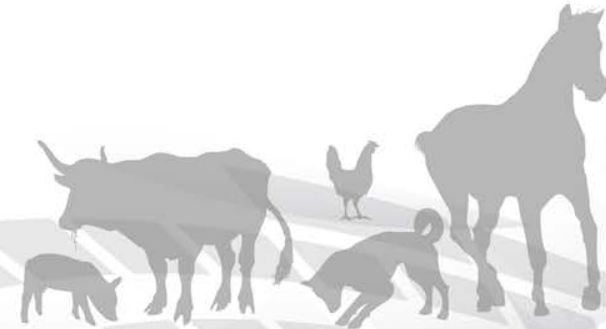
- 
- ✓ E'una delle emergenze sanitarie del terzo millennio e fra le cause c'è un'errata somministrazione di questi medicinali insieme all'uso/abuso nel tempo....
  - ✓ .. influenza sull'aumento e diffusione di microrganismi resistenti alla loro azione, con conseguente perdita di efficacia delle terapie e gravi rischi per la salute pubblica.



# Uso e abuso di antibiotici

**Studi comprovano il legame tra** l'uso degli antimicrobici negli animali e le infezioni causate da batteri resistenti nell'uomo e focalizzati **sulla probabilità che i batteri resistenti, selezionati negli animali dalla pressione selettiva dovuta all'uso di antibiotici, possano essere trasferiti all'uomo** per differenti vie:

- contatto diretto con l'animale, consumo di alimenti contaminati con batteri resistenti
- diffusione di batteri resistenti in reservoirs ambientali da cui i geni di resistenza potrebbero venire direttamente a contatto con gli esseri umani o essere trasferiti direttamente a batteri in grado di colonizzare l'organismo umano.



- Quindi batteri zoonotici multiresistenti selezionati negli animali come Salmonella e Campylobacter o E.coli STEC, ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (*MSRA*), *E. coli* resistente alle  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL), Enterobatteri resistenti ai carbapenemi e altri ancora possono essere trasmesse all'uomo attraverso gli alimenti derivati
- oggi la capacità dei batteri di adattarsi ai farmaci - tramite mutazioni, ricombinazione del DNA plasmidico o trasferimento genico mediato da integroni - supera quella di sviluppo e innovazione dell'industria farmaceutica



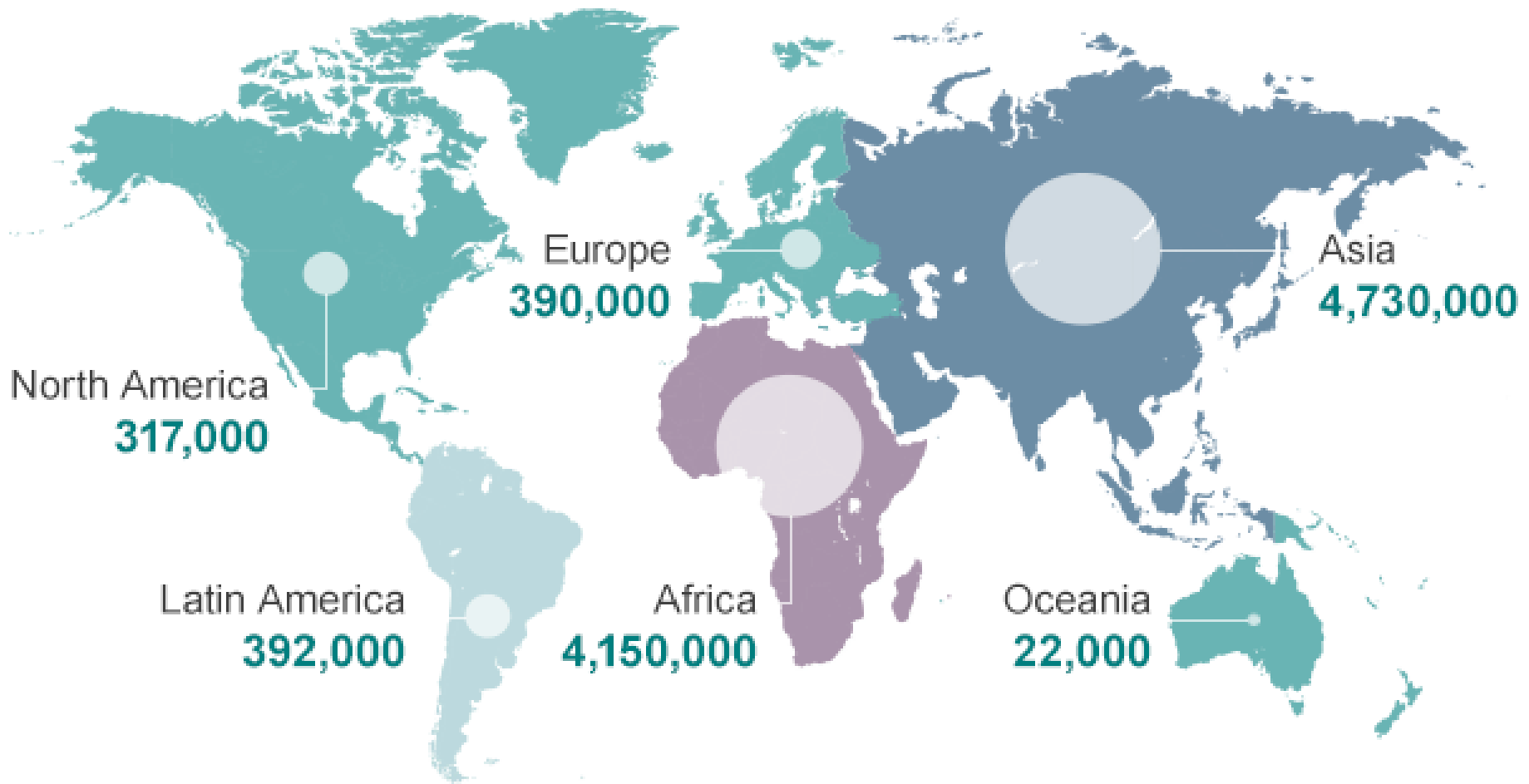


IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

 *Campylobacter*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

**In Europa e negli Stati Uniti, la resistenza antimicrobica causa almeno 50.000 morti ogni anno. E senza controlli, le morti aumenterebbero di più di 10 volte entro il 2050**

**Deaths attributable to antimicrobial resistance every year by 2050**



Source: Review on Antimicrobial Resistance 2014

# CAUSES OF ANTIBIOTIC RESISTANCE



Antibiotic resistance happens when bacteria change and become resistant to the antibiotics used to treat the infections they cause.



Over-prescribing of antibiotics



Patients not finishing their treatment



Over-use of antibiotics in livestock and fish farming



Poor infection control in hospitals and clinics



Lack of hygiene and poor sanitation



Lack of new antibiotics being developed

[www.who.int/drugresistance](http://www.who.int/drugresistance)

**#AntibioticResistance**



**World Health Organization**

# Quanti antimicrobici si consumano??

 *Campylobacter*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

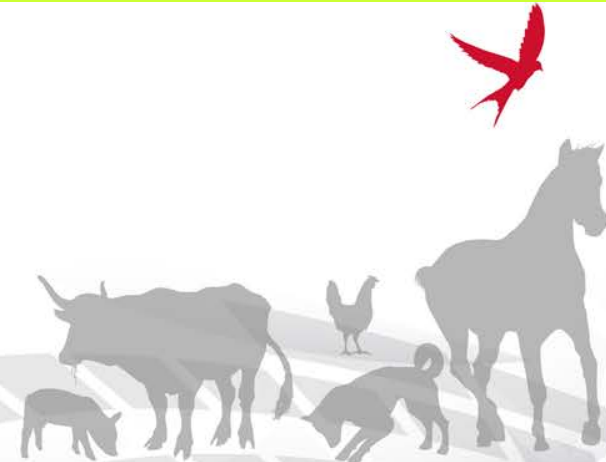
- ✓ La stima del consumo annuo di antibiotici in EU va da 63000 a 240.000 tonn /anno con stime di uso globale prevista in aumento
- ✓ In USA il consumo annuo di comuni molecole negli animali è più del doppio che nell'uomo



30%  
utilizzati  
dall'uomo

70%  
consumati  
dagli animali

In acquacoltura, le dosi di antibiotici possono essere più elevate in proporzione rispetto a quelle del bestiame

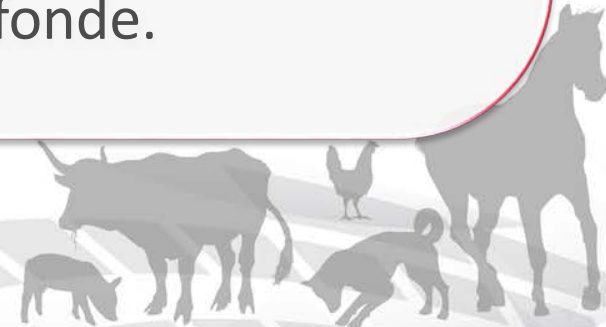


# Il uso nella produzione di alimenti passa attraverso l'ambiente attraverso i rifiuti di origine animale

**Campylobacter**  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

**Rapporto  
FDA 2011**

- In USA Il 93 % degli antibiotici importanti in medicina umana sono somministrati agli animali tramite mangimi o acqua e dal 75-90% degli antibiotici testati vengono escreti non metabolizzati da animali entrando nei sistemi fognari e nelle fonti d'acqua o nelle colture quando il concime prodotto viene utilizzato come fertilizzante.
- Circa il 90% degli antibiotici utilizzati finisce nell'ambiente; in questo modo la resistenza passa anche attraverso il suolo, le acque, l'aria, la catena alimentare e si diffonde.

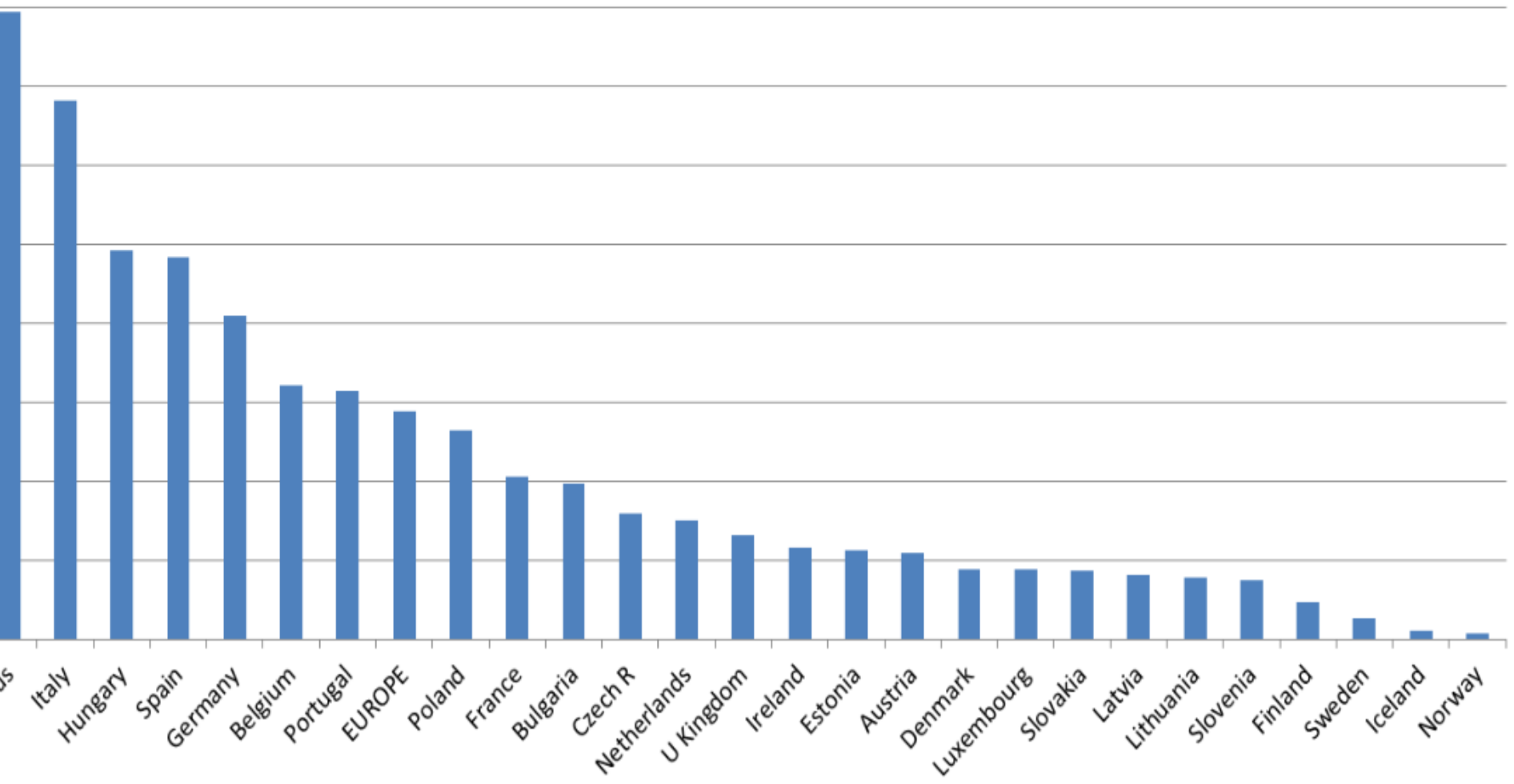




# ESVAC 2012 consumption (report 2013)

pcu = population (all food producing species) correction unit

■ Antimicrobial usage (mg/pcu)

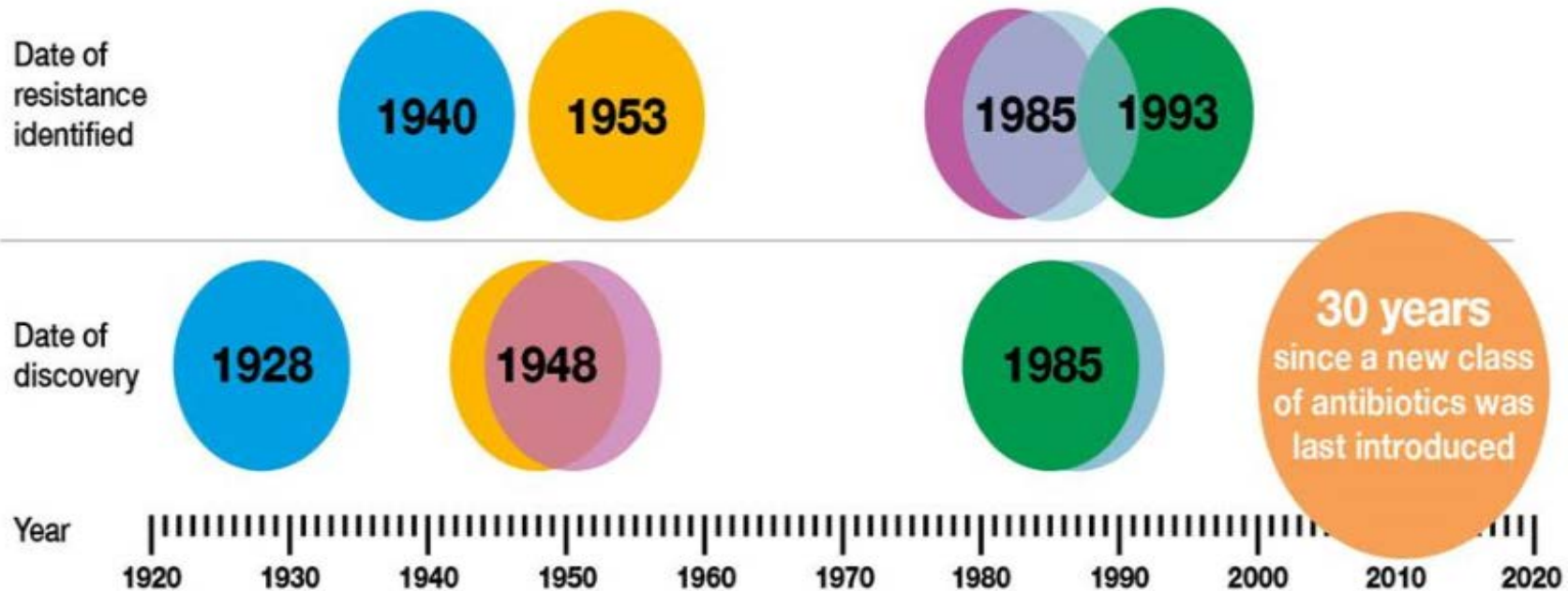
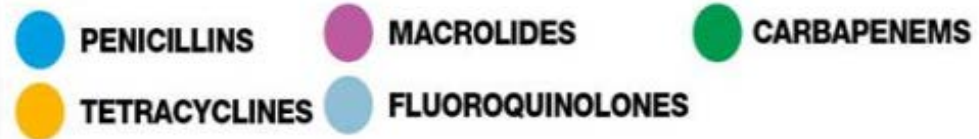


# Cronologia della moderna scoperta di antibiotici e susseguenti resistenze

(fonte: Public Health England)

## Antibiotic discovery and resistance timeline

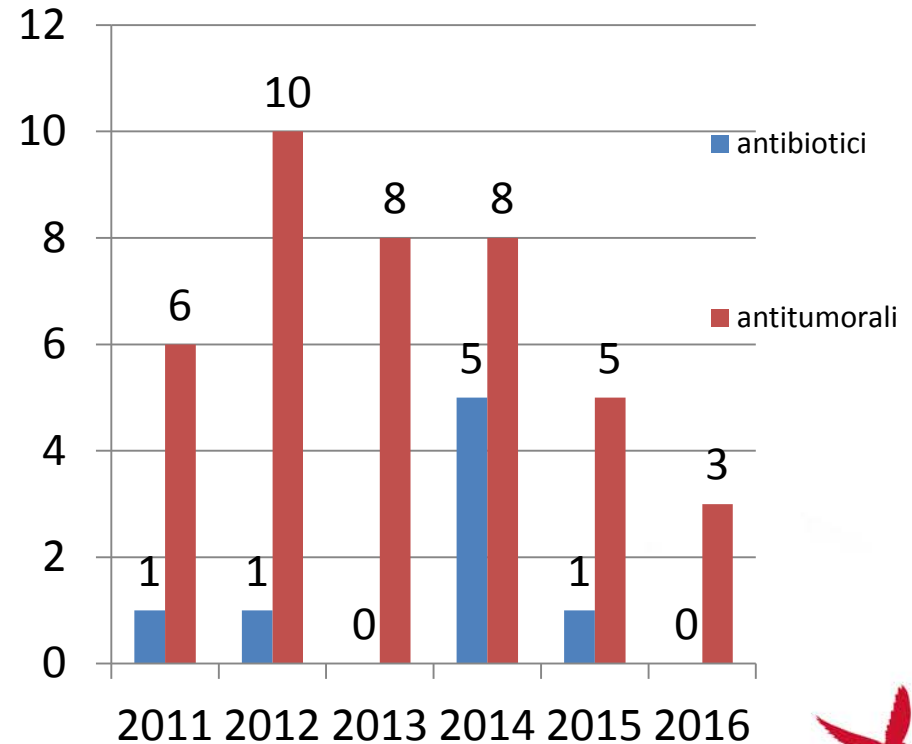
### Antibiotic class



# Nuovi farmaci approvati dall'FDA

([www.fda.gov](http://www.fda.gov))


Negli ultimi 6 anni l'FDA ha approvato 40 farmaci antitumorali contro 8 nuove formulazioni antibiotiche



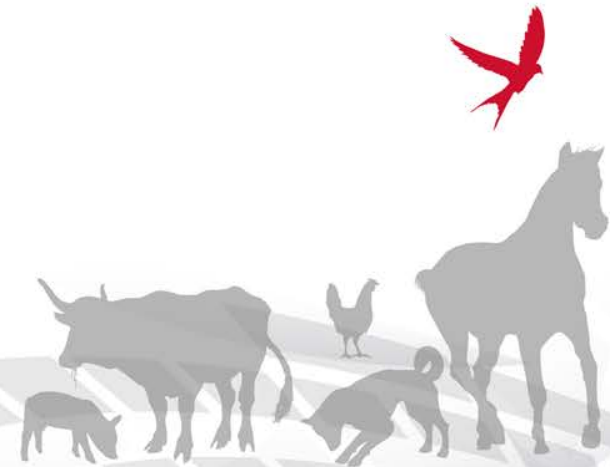
✓ la difficoltà di identificare nuovi agenti antimicrobici rende necessario lo sviluppo di approcci alternativi atti a contrastare la diffusione di batteri resistenti



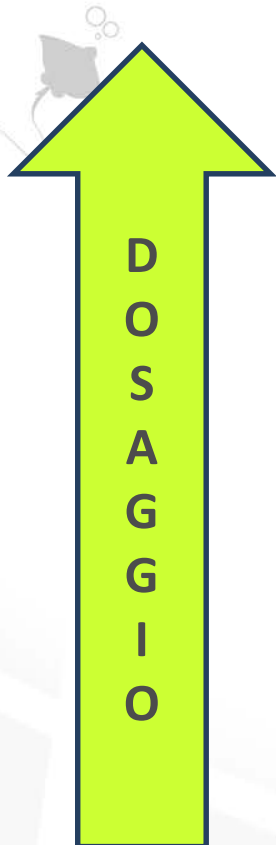
# Resistenza: Fenomeno inevitabile?



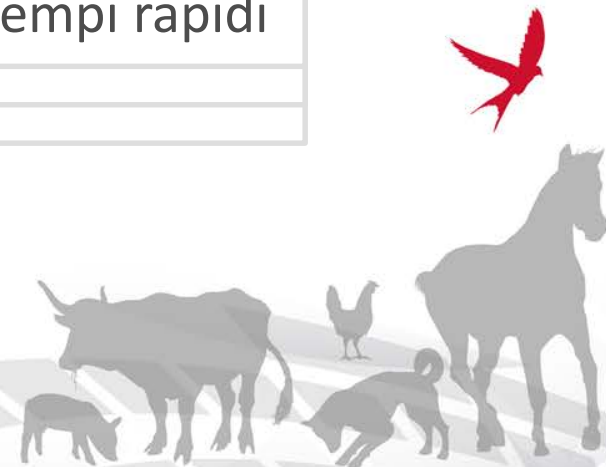
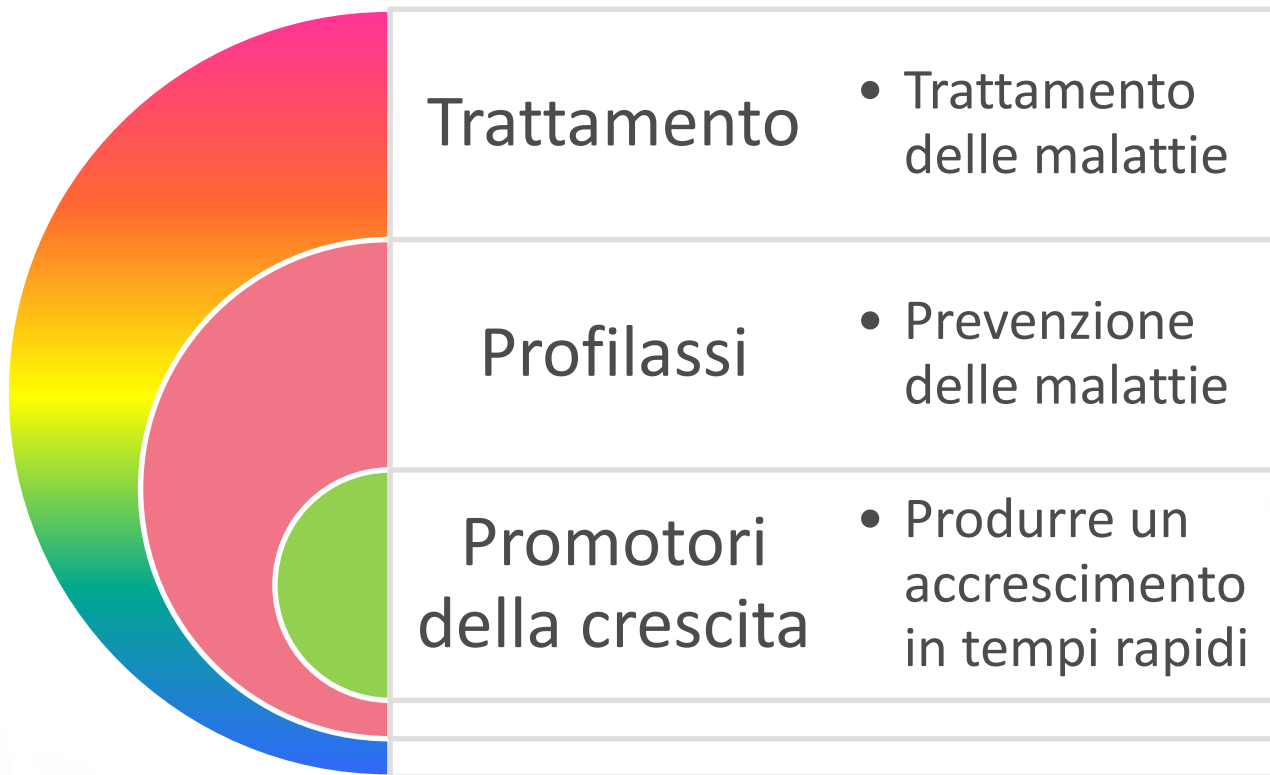
✓ Come Fleming anticipò nel discorso tenuto alla consegna del Premio Nobel, l'antibiotico-resistenza è un fenomeno evolutivo inevitabile, e che ciò che più lo preoccupava era la possibilità che l'uso scorretto di antibiotici potesse velocizzarne lo sviluppo e la diffusione



# Perché si utilizzano antibiotici negli allevamenti?



D  
O  
S  
A  
G  
G  
I  
O



# Ma il loro utilizzo è sempre un vantaggio economico?

- chiare evidenze scientifiche dicono che il loro utilizzo **non sempre produce un beneficio economico**, soprattutto in realtà zootecniche ed agricole avanzate. **Al contrario, animali ben curati e alloggiati in modo adeguato sono meno inclini alle infezioni e richiedono meno antibiotici.**
- **L'OIE incoraggia la ricerca di sistemi alternativi all'uso di questi farmaci**, incluso lo studio di strumenti e metodologie di gestione "animal welfare-friendly" che rispettando il benessere degli animali produttori potrebbero ridurre la dipendenza del settore zootecnico nei confronti degli antimicrobici.



# Dove si trovano i geni responsabili della resistenza?



I geni per la resistenza agli antibiotici sono diffusi ovunque.



Uno studio condotto da microbiologi e genetisti dell'Università di Lione che hanno preso in considerazione ben 71 differenti tipi di ambiente – dal suolo alle feci umane, dal permafrost all'intestino delle galline, fino alle acque dell'oceano – ha evidenziato **che in tutti, nessuno escluso**, erano presenti microrganismi portatori di geni per la resistenza agli antibiotici

- ✓ Recenti studi di sequenziamento genico hanno evidenziato che i genomi delle comunità batteriche di origine ambientale costituiscono una ampia riserva di geni di resistenza agli antibiotici, nota come “resistoma”.






# Studio del fenomeno

- 
- ✓ Oggi, le tecniche di laboratorio che non richiedono l'isolamento batterico, come l'analisi metagenomica basata sui dati NGS, sono strumenti fondamentali per studiare il fenomeno e rivelare la diversità dei sistemi di resistenza agli antibiotici presenti nell'ambiente.
  - La Metagenomica è lo studio di tutte le sequenze genomiche di una comunità di organismi. Utilizzando un approccio metagenomico è possibile determinare ARGs in complesse comunità microbiche ambientali, esplorando l'intera resistenza. Questa tecnologia consente anche l'identificazione di ARGs che risiedono su elementi genetici mobili (MGE). Gli ARGs possono essere scambiati tra batteri e agenti patogeni tramite il trasferimento genico orizzontale (HGT) attraverso MGEs (Dos Santos et al., 2017).
- 



# Studio in corso

- 
- ✓ aumentare la conoscenza del fenomeno di resistenza antibiotica nel settore del pollame con l'obiettivo di migliorare le produzioni animali, la sicurezza alimentare, la salute pubblica e il benessere degli animali
  - ✓ Valutare gli effetti dell'applicazione di misure che mirano a ridurre l'uso degli antibiotici






# Obiettivo proposto

- Questo obiettivo sarà raggiunto studiando il resistoma e il microbioma nel pollo da carne, nei prodotti alimentari derivati e nell'ambiente in cui vivono, valutando nel contempo il livello di benessere degli animali. In particolare, verranno verificate le differenze nella composizione microbica e nell'abbondanza dei geni di resistenza agli antibiotici negli animali allevati in condizioni diverse (densità di allevamento, gestione, strutture, linea genetica, dieta) .



**antibiotic  
FREE**

# Perché il pollo

- 
- In Europa ogni anno vengono allevati circa 5,9 miliardi di pulcini di pollo da carne.
  - Evidenze scientifiche dimostrano chiaramente come l'allevamento industriale del pollo da carne causi seri problemi di salute e benessere negli animali. La maggior parte degli allevamenti sono intensivi, con animali selezionati per avere un rapido tasso di crescita, in capannoni senza finestre, con densità di popolazione elevata per tutta la durata della loro vita (5-7 settimane).
  - difficoltà di locomozione, problemi cardiovascolari e respiratori





 **Campylobacter**  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

# Selezione degli allevamenti di broiler e valutazione del benessere degli animali.



- ✓ I gruppi di polli da cui saranno raccolti i campioni saranno selezionati in base al consumo di antibiotici e ai diversi metodi di produzione.
- ✓ Per ogni gruppo sarà effettuata la misura del livello di benessere animale sulla base del protocollo Welfare Quality, sviluppato per il pollame.





# Campionamento al macello e in allevamento e analisi di laboratorio


 *Campylobacter*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

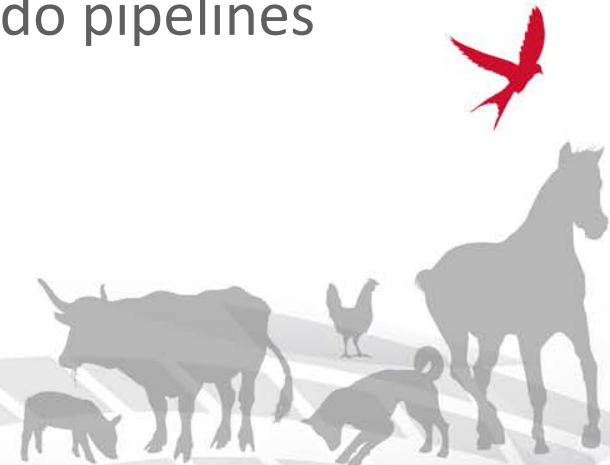


- ✓ Prelievo dei campioni in allevamento e al macello, sia sugli animali che sull'ambiente
- ✓ isolamento microbiologico per il panel di batteri selezionati (patogeni e indicatori) e a determinazione dell'R-type degli isolati.
- ✓ Identificazione della popolazione batterica tramite analisi metagenomica del microbioma e del resistoma.




# Analisi metagenomica

- 
- **L'analisi metagenomica del microbioma e del resistoma** sarà effettuata usando il 16S rDNA (16S) metabarcoding e il Whole Genome Shot Gun (WGsg).
  - Saranno utilizzate due differenti piattaforme NGS : Illumina Next Seq 500 e MinION della Oxford Nanopore Technologies.
  - La previsione del fenotipo di resistenza dal genotipo sarà effettuata con strumenti bioinformatici (QIIME, DIAMOND, MetaPhlAn, Centrifuge, Kraken e sviluppando pipelines specifiche).








# Analisi metagenomica



● Gli ARGs saranno identificati e annotati utilizzando differenti databases, come il National Center for Biotechnology Information NR, l'Antibiotic Resistance Gene Database (ARDB), l'Antibiotic Resistance Genes Online (ARGO), il Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD). Il sequenziamento di terza generazione come la tecnologia Oxford Nanopore che produce letture molto lunghe aiuterà a ottenere le sequenze dei geni di resistenza insieme alle sequenze fiancheggianti. Questo approccio fornirà informazioni dirette sugli ARG e sugli elementi genetici mobili dei batteri, che sono di particolare interesse per la valutazione della resistenza multiforme e del potenziale trasferimento genetico orizzontale.



# Analisi dei dati



I dati raccolti saranno analizzati per valutare i legami fra i trattamenti antimicrobici, le condizioni di allevamento, i sistemi di gestione, il livello di benessere animale e la presenza di specifiche composizioni del microbioma, dei patterns di resistenza agli antibiotici nella flora batterica degli animali, nei prodotti alimentari e nell'ambiente di allevamento.







IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

 *Campylobacter*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

✓ Giuliano Garofolo

 ✓ Zilli Katuscia

✓ Tiziana Persiani

✓ Francesca Marotta

✓ Salvatore Silvana

✓ Alessiani Alessandra

✓ Anna Janowicz

✓ Lisa di Marcantonio

✓ Romina Romantini

✓ Diana Neri

✓ Anna Abass

✓ Lorena Sacchini

# Ringraziamenti





IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

 *Campylobacter*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE

