

INDAGINE IN SUINI DOMESTICI E SELVATICI DELLA PROVINCIA DI BRESCIA PER EVIDENZIARE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTTORI DI B-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO ED AMPC

INVESTIGATION OF EXTENDED-SPECTRUM AND AMPC B -LACTAMASES-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN DOMESTIC AND WILD SUIDAE IN THE PROVINCE OF BRESCIA

GUARNERI F.¹, FORMENTI N.¹, CALÒ S.¹, PARISIO G.¹, BIRBES L.¹, PITOZZI A.¹,
SCALI F.¹, TONNI M.¹, GUADAGNO F.¹, GIOVANNINI S.¹, SALOGNI C.¹,
IANIERI A.², BELLINI S.¹, PASQUALI P.³, ALBORALI G.L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;*

²*Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma;*

³*Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità*

Parole Chiave: suidi, gene CTX-M, classi di età

Key Words: suids, CTX-M gene, age classes

RIASSUNTO

L'antibiotico resistenza (AMR) rappresenta un complesso problema globale. *Escherichia coli* β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) e AmpC (AmpC) sono di principale interesse per le ampie ripercussioni sanitarie. Tra le specie ospite, quelle selvatiche rivestono un ruolo importante e, in particolare, il cinghiale per il costante aumento delle sua densità di popolazione e i dati ancora limitati sull'AMR. Pertanto, sono stati investigati la diffusione di *E. coli* produttori ESBL/AmpC e i fattori epidemiologici ad essi associati in 1504 cinghiali provenienti da quattro aree della provincia di Brescia e, in maniera preliminare, è stato condotto un confronto con i dati emersi dalla sorveglianza dei geni di resistenza ESBL/AmpC in *E. coli* isolati in 80 maiali della stessa provincia.

Nei cinghiali è emersa una prevalenza del 15,96% di *E. coli* ESBL/AmpC, supportata dal riscontro dei geni CTX-M (12,3%), TEM (6,98%), CMY (0,86%) e SHV (0,47%), la quale è risultata essere maggiore negli animali giovani rispetto ad adulti e sub-adulti. Nei suini, sono emerse prevalenze di CTX-M (85%), SHV (6,25%), CMY (10%) e TEM (55%) significativamente più alte di quelle dei cinghiali suggerendo un uso eccessivo di antibiotici negli allevamenti suini. Ulteriori analisi sarebbero auspicabili per investigare *E. coli* ESBL/AmpC in allevamenti e aree di smaltimento in sovrapposizione spaziale con le popolazioni di cinghiale per definire se la loro presenza possa influenzarne la diffusione nella specie selvatica.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) represents a complex global issue. Extended-spectrum β -lactamases and AmpCs (ESBL/AmpC) *Escherichia coli* deserves attention for their broad repercussions, also on public health. Moreover, wild host species are of interest and particularly wild boar. Indeed, the constant increasing of its population densities and the still limited data about AMR lead to health risks where spatial overlap with domestic animals and

humans occurs. Therefore, prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* and the associated epidemiological factors were investigated in 1504 wild boars from four areas of the province of Brescia and, as a preliminary step, a comparison was made with data from the surveillance of ESBL/AmpC resistance genes in *E. coli* isolated from 80 pigs from the same province. A prevalence of 15.96% of ESBL/AmpC-producing *E. coli*, supported by CTX-M (12.3%), TEM (6.98%), CMY (0.86%) and SHV (0.47%) genes detection, emerged in wild boar. Young animals were more infected by ESBL/AmpC strains and CTX-M than older ones. In swine, prevalences of CTX-M (85%), SHV (6.25%), CMY (10%) and TEM (55%) were recorded and resulted significantly higher than those of wild boars leading to an over-use of antibiotics in pigs farms. Further analyses would be desirable to investigate *E. coli* ESBL/AmpC on both farms and in disposal areas present in spatial overlap with wild boar to investigate whether the presence of these strains may influence their spread in this wild species.

INTRODUZIONE

L'antibiotico resistenza (AMR) rappresenta un problema di rilevanza mondiale (Wasyl et al., 2018). Gli animali possono avere un ruolo da reservoir di microrganismi non necessariamente patogeni ma resistenti agli antimicrobici che, attraverso il contatto diretto o la catena alimentare, possono contribuire alla diffusione e/o al mantenimento dell'AMR in ambito umano (Dahms et al., 2015). Numerosi sono i batteri che concorrono a rendere complesso il problema della resistenza agli antimicrobici e fra questi, uno dei principali, è *Escherichia coli*, microrganismo ubiquitario che può comportarsi sia da commensale che da patogeno, responsabile di infezioni intestinali ed extra-intestinali in numerosissime specie animali, uomo compreso (Wu et al., 2013). Tra i ceppi di *E. coli* su cui va posta particolare attenzione, vi sono quelli produttori di β -lattamasi, a spettro esteso (ESBL) e di altre β -lattamasi quali le AmpC codificate da geni a localizzazione plasmidica (von Salviati et al., 2015). Essi conferiscono resistenza alla maggior parte degli antibiotici beta-lattamici, comprese le cefalosporine di terza e quarta generazione, limitando in maniera preoccupante le opzioni di trattamento in caso di infezione. L'aumento della prevalenza di *E. coli* produttori di ESBL/AmpC rende sempre più difficoltoso il controllo delle patologie nel suino (*Sus scrofa domesticus*) e rappresenta un grave problema di sanità pubblica (Agersø e Aarestrup, 2013). Inoltre, la presenza di *E. coli* ESBL/AmpC è stata segnalata anche negli animali da compagnia, in quelli da zoo e nella fauna selvatica (Vale et al., 2020; Holtmann et al., 2021). Nello specifico, le specie a vita libera non sono generalmente trattate con antimicrobici e possono acquisire batteri AMR o residui antimicrobici attraverso cibo e acqua in ambienti contaminati da animali domestici o dall'uomo (Heuer et al., 2011). Infatti, negli animali selvatici che frequentano ambienti antropizzati o che sono in stretto contatto con persone o aree agricole è stato dimostrato un livello più elevato di AMR (Tinoco Torres et al., 2020). Fra queste specie, il cinghiale (*Sus scrofa*) risulta essere un indicatore importante per la valutazione della diffusione ambientale di geni di resistenza (Dahms et al., 2015), sebbene i dati disponibili sull'AMR, soprattutto rispetto ai fattori epidemiologici che possono influenzarne la diffusione, siano al momento limitati. Tali aspetti risultano di particolare interesse in questa specie in quanto "invasiva", filogeneticamente molto vicina al maiale, con densità di popolazione in netto aumento e possibilità di contatto con i suini domestici e con aree maggiormente antropizzate. Pertanto, sono stati investigati la diffusione di *E. coli* produttori ESBL/AmpC e i fattori epidemiologici associati alla loro presenza e alla trasmissione in cinghiali di diverse aree della provincia di Brescia e, in maniera preliminare, è stato condotto un confronto con i dati emersi dalla sorveglianza dei geni di resistenza ESBL/AmpC in *E. coli* isolati dai maiali nella stessa provincia.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nell'ambito dell'attività della sezione Diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna di Brescia (IZSLER), sono stati prelevati complessivamente 1504 campioni di feci di cinghiale provenienti da 4 settori venatori della provincia di Brescia (Figura 1) durante tre stagioni di caccia. Per ciascun soggetto sono stati registrati il genere e l'età (Tabella 1).



Figura 1 Rappresentazione dei quattro settori venatori che formano l'area di studio.
Figure 1 Map of the four hunting areas that formed the study area.

Tabella 1 Distribuzione dei cinghiali per struttura di popolazione nei settori di caccia e nelle stagioni venatorie.

Table 1 Distribution of wild boar by age class, gender, hunting areas and hunting seasons

	Fattore	N	Giovani (%)	Sub-adulti (%)	Adulti (%)	Femmine (%)	Maschi (%)
Settore	Ambito Territoriale Caccia (ATC)	506	10,47	24,11	65,42	56,72	43,28
	Comprensorio Alpino (CA) 6	63	28,57	28,57	42,86	38,10	61,90
	CA 7	79	29,11	25,32	45,57	49,37	50,63
	CA 8	856	29,32	24,30	46,38	52,80	47,20
Stagioni venatorie	2017-2018	525	19,24	26,29	54,48	54,29	45,71
	2018-2019	381	23,36	18,37	58,27	49,34	50,66
	2019-2020	598	25,92	26,76	47,32	55,02	44,98

Parallelamente, sono stati raccolti un totale di 80 campioni di feci di suini durante 4 anni di studio (2017-2020) (Tabella 2). In particolare, i soggetti conferiti presentavano sintomatologia gastro-enterica o diarrea e provenivano da 80 aziende (ingrasso = 33, riproduzione = 47; media dei capi = 3572; consistenza media = 4038 capi) della provincia di Brescia.

Tabella 2 Numero di campioni fecali di suino (N) analizzati per ciascun anno di studio; ogni campione proviene da un soggetto diverso.

Table 2 Number of pig faecal samples (N) collected per year. Each sample came from a different pig.

Anno di conferimento	N
2017	6
2018	45
2019	17
2020	12

Isolamento e identificazione di E. coli ESBL/AmpC positivi

L'identificazione dei ceppi isolati dai cinghiali è stata effettuata secondo un procedimento che prevede una fase di pre-arricchimento stemperando un'aliquota di materiale in acqua peptonata tamponata in rapporto 1:10. Dopo aver incubato il campione a 37±1°C per 18-22 ore viene eseguito un trapianto su una piastra di agar MacConkey addizionato di 1 mg/L di cefotaxime per garantire l'isolamento di batteri ESBL/AmpC (Van Damme et al., 2017). Sulla base della colorazione e della morfologia sono state selezionate le colonie sospette che sono state successivamente sottoposte a caratterizzazione molecolare.

Analisi dei geni di resistenza

Una singola colonia batterica di ogni campione positivo alla prova microbiologica è stata risospesa in 250µl di acqua DNase-Rnase free e il DNA è stato estratto attraverso lisi-bollitura (98°C per 10minuti). L'identificazione di *E. coli* è stata condotta tramite analisi del gruppo filogenetico in PCR (dati non mostrati) mentre il rilevamento dei geni di resistenza è stato eseguito con un altro pannello di reazioni. Nello specifico, una PCR multipla è stata utilizzata per l'identificazione dei geni del gruppo CTX-M (Woodford et al., 2006); PCR singole sono state utilizzate per il gene SHV (Arlet et al., 1997), il TEM (Mabilat et al., 1990) e il CMY (Dierikx et al., 2010). Tutti gli ampliconi risultati positivi ai geni TEM e SHV sono stati sequenziati (Baldo et al., 2020).

Analisi statistica

Per i cinghiali, l'analisi statistica è stata condotta su tre livelli: analisi descrittiva dei soggetti abbattuti, stima della prevalenza apparente con i relativi intervalli di confidenza stimati con metodo esatto, analisi dei fattori associati alla prevalenza. Gli esiti (positivo/negativo) dell'analisi microbiologica e della ricerca di ciascun gene sono stati analizzati tramite modelli di regressione logistica (GLM). Il modello stima la probabilità del cinghiale di essere positivo in base alle covariate: genere, età, settore di caccia e stagione venatoria. I modelli sono stati confrontati con il Likelihood Ratio Test (LRT).

Rispetto ai maiali, lo studio è ancora in fase preliminare per cui è stata condotta la sola analisi descrittiva con la stima della prevalenza apparente. Inoltre, è stato effettuato il confronto tra le prevalenze riscontrate in cinghiali e suini tramite il test binomiale esatto.

Le analisi statistiche sono state condotte con il software R versione 4.0.3 (R Core Team, 2020).

I risultati sono stati considerati statisticamente significativi se il p-value (p) è minore di 0,05.

RISULTATI

Dall'analisi microbiologica dei cinghiali è emersa una prevalenza complessiva di *E. coli* ESBL/AmpC del 15,96% (240/1504, 95% C.I. 14,14% – 17,91%). L'analisi statistica ha messo in evidenza che l'età dei soggetti, la stagione venatoria e i settori di caccia hanno un effetto sulla probabilità che un soggetto risulti positivo al test (Tabella 3). Infatti, nei giovani è stata riscontrata una probabilità maggiore di avere *E. coli* ESBL/AmpC rispetto agli adulti (p=0,0207) e ai sub-adulti (p=0,0098). Nei cinghiali abbattuti nella stagione venatoria 2017-2018 la probabilità di essere positivo è significativamente maggiore rispetto a quelli della stagione venatoria 2018-2019 (p=0,0232) e 2019-2020 (p=0,0015). I cinghiali abbattuti nel CA7 hanno una probabilità maggiore di avere *E. coli* ESBL/AmpC rispetto a quelli del CA8 (p=0,0033) (Tabella 3). Non sono emerse altre differenze significative (p>0,05).

Tabella 3 Prevalenze di *E. coli* ESBL/AmpC nei cinghiali, suddivise per genere, classe di età, stagione venatoria e settore di caccia.

Table 3 Results of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in wild boars by gender, age class, hunting season and hunting area.

Fattore		Positivi	Totale	Prevalenza %	95% C.I.
Genere	Femmina	129	802	16,08	13,61 – 18,81%
	Maschio	111	702	15,81	13,19 – 18,72%
Classe di età	Giovani	71	345	20,58	16,44 – 25,24%
	Sub-adulti	49	368	13,32	10,02 – 17,22%
	Adulti	120	791	15,17	12,74 – 17,86%
Stagione venatoria	2017-2018	108	525	20,57	17,19 – 24,29%
	2018-2019	55	381	14,44	11,06 – 18,37%
	2019-2020	77	598	12,88	10,30 – 15,83%
Settore	ATC Unico	83	506	16,40	13,28 – 19,92%
	CA 6	11	63	17,46	9,05 – 29,10%
	CA 7	22	79	27,85	18,35 – 39,07%
	CA 8	124	856	14,49	12,20 – 17,02%

Rispetto ai geni di resistenza, la prevalenza complessiva del CTX-M nei *E. coli* isolati nei cinghiali è del 12,3% (185/1504, 95% C.I. 10,68% – 14,07%). Dal modello statistico emerge che la stagione venatoria e la classe di età hanno un effetto sulla presenza di questo gene (Tabella 4). Infatti, nei ceppi isolati nei giovani c'è una probabilità maggiore di riscontrare il CTX-M rispetto a quelli dei sub-adulti (p=0,0197) e degli adulti (p=0,0090) (Tabella 4). I soggetti abbattuti nel 2017-2018 hanno una prevalenza di questo gene significativamente maggiore rispetto a quelli del 2019-2020 (p=0,0005). Non sono emerse altre differenze statisticamente significative (p>0,05).

Tabella 4 Prevalenze del gene CTX-M riscontrate nei *E. coli* isolati dai cinghiali, suddivise per genere, classe di età, stagioni venatorie e settore di caccia.

Table 4 Prevalence of the CTX-M gene found in *E. coli* isolated from wild boar; by gender, age class, hunting season and hunting area.

Fattore		Positivi	Totale	Prevalenza %	95% C. I.
Genere	Femmina	96	802	11,97	9,8 – 14,42%
	Maschio	89	702	12,68	10,31 – 15,37%
Classe di età	Giovani	57	345	16,52	12,76 – 20,87%
	Sub-adulti	37	368	10,05	7,18 – 13,59%
	Adulti	91	791	11,5	9,36 – 13,94%
Stagione venatoria	2017-2018	84	525	16,00	12,97 – 19,42%
	2018-2019	48	381	12,60	9,44 – 16,35%
	2019-2020	53	598	8,86	6,71 – 11,43%
Settore	ATC Unico	66	506	13,04	10,23 – 16,29%
	CA 6	10	63	15,87	7,88 – 27,26%
	CA 7	14	79	17,72	10,04 – 27,94%
	CA 8	95	856	11,10	9,07 – 13,40%

Per il gene di resistenza CMY, la prevalenza complessiva emersa nei *E. coli* isolati nei cinghiali è del 0,86% (13/1504, 95% C.I. 0,46% - 1,47%). Dall'analisi statistica non sono emersi effetti significativi ($p > 0,05$). Rispetto al gene di resistenza SHV, la prevalenza apparente emersa nei *E. coli* isolati nei cinghiali è del 0,47% (7/1504, 95% C.I. 0,19% – 0,96%). L'analisi delle sequenze degli ampliconi ha messo in evidenza la presenza di SHV-12 (7/7). Dal modello statistico non sono emersi effetti significativi ($p > 0,05$).

Per il gene di resistenza TEM, la prevalenza apparente riscontrata è del 6,98% (105/1504, 95% C.I. 5,74% - 8,39%). L'analisi delle sequenze degli ampliconi ($n=98$, in sette casi non è stato possibile effettuare il sequenziamento) ha messo in evidenza la presenza di TEM-1 e sue varianti (92/98), TEM-33 (1/98), TEM-135 (2/98), TEM-176 (3/98). La stagione venatoria influenza la probabilità di riscontrare il gene: i soggetti abbattuti nella stagione venatoria 2017-2018 hanno una prevalenza di questo gene significativamente maggiore rispetto a quelli abbattuti nella stagione venatoria 2018-2019 ($p=0,0186$) e 2019-2020 ($p=0,0368$) (Tabella 5). Non sono emerse altre differenze statisticamente significative ($p > 0,05$).

Tabella 5 Prevalenze del gene TEM riscontrate nei *E. coli* isolati dai cinghiali, suddivise per genere, classe di età, stagioni venatorie e settore di caccia.

Table 5 Prevalence of the TEM gene found in *E. coli* isolated from wild boar, by gender, age class, hunting season and hunting area.

Fattore		Positivi	Totale	Prevalenza %	95% C. I.
Genere	Femmina	58	802	7,23	5,54 – 9,25%
	Maschio	47	702	6,70	4,96 – 8,80%
Classe di età	Giovani	27	345	7,83	5,22 – 11,18%
	Sub-adulti	19	368	5,16	3,14 – 7,95%
	Adulti	59	791	7,46	5,73 – 9,52%
Stagione venatoria	2017-2018	49	525	9,33	6,98 – 12,15%
	2018-2019	21	381	5,51	3,44 – 8,30%
	2019-2020	35	598	5,85	4,11 – 8,05%
Settore	ATC Unico	46	506	9,09	6,73 – 11,94%
	CA 6	4	63	6,35	1,76 – 15,47%
	CA 7	7	79	8,86	3,64 – 17,41%
	CA 8	48	856	5,61	4,16 – 7,37%

Per quanto concerne le analisi molecolari sui maiali, la prevalenza apparente per il gene CTX-M è di 85% (68/80, 95% C.I. 75,26% – 92,00%), quella per SHV è di 6,25% (5/80, 95% C.I. 2,06% – 13,99%), 10% (8/80, 95% C.I. 4,42% - 18,76%) per il CMY e 55% (44/80, 95% C.I. 43,47% - 66,15%) per il gene TEM (Tabella 6).

Tabella 6 Prevalenze dei singoli geni di resistenza riscontrati in *E. coli* nei maiali, suddivisi per anno di conferimento e tipologia di allevamento.

Table 6 Prevalence of individual resistance genes found in *E. coli* from pigs by year of sample collection and breeding type.

Fattore CTX-M		Prevalenza (%)			
		SHV	TEM	CMY	
Anno di conferimento	2017	66,67 (4/6)	0 (0/6)	16,67 (1/6)	33,33 (2/6)
	2018	91,11 (41/45)	6,67 (3/45)	60 (27/45)	13,33 (6/45)
	2019	76,47 (13/17)	11,76 (2/17)	52,94 (9/17)	0 (0/17)
	2020	83,33 (10/12)	0 (0/12)	58,33 (7/12)	0 (0/12)
Tipologia	Ingrasso	90,91 (30/33)	0 (0/33)	60,61 (20/33)	9,09 (3/33)
	Riproduzione	80,85 (38/47)	10,64 (5/47)	51,06 (24/47)	10,64 (5/47)

Il confronto statistico tra le prevalenze dei geni di resistenza nelle due specie analizzate ha messo in evidenza una differenza significativa. In particolare, i valori riscontrati nei suini sono maggiori rispetto a quelli ottenuti nei cinghiali, rispettivamente per CTX-M, CMY, TEM e SHV ($p < 0,001$).

DISCUSSIONE

Il presente lavoro ha messo in evidenza una preoccupante diffusione di *E. coli* ESBL/AmpC in entrambi i suidi analizzati. Le prevalenze maggiori sono state riscontrate nei maiali. Da un'analisi statistica più approfondita, condotta specificatamente sui cinghiali, è emerso che nei soggetti giovani c'è maggiore probabilità di riscontrare ceppi ESBL/AmpC e il gene di resistenza CTX-M rispetto alle altre classi di età e che nella stagione venatoria 2017-2018 la diffusione di questi, e del gene TEM, è stata maggiore rispetto alle altre due, 2018-2019 e 2019-2020.

Per quanto concerne la positività alla prova microbiologica e il riscontro dei geni di resistenza nei cinghiali, il presente studio conferma quanto già noto in letteratura per questa specie (Poeta et al., 2009; Alonso et al., 2017; Plaza-Rodríguez et al., 2021). Le prevalenze emerse risultano maggiori rispetto a quanto riscontrato in precedenza (Literak et al., 2010; Wasyl et al., 2018; Bonardi et al., 2019), tuttavia, l'assenza di una standardizzazione del metodo diagnostico rende difficoltosa la comparazione tra risultati di studi differenti (Tinoco Torres et al., 2020). I modelli statistici hanno messo in evidenza una maggiore diffusione di *E. coli* ESBL/AmpC e del gene CTX-M negli animali giovani rispetto ai sub-adulti e adulti. Per quanto ci è noto, nell'unico lavoro disponibile in cui è stato condotto un confronto tra classi di età relativi alla diffusione di questi ceppi nei cinghiali non sono emerse differenze significative (Holtmann et al., 2021). Tuttavia, il fatto che i suinetti domestici abbiano una maggiore suscettibilità per i ceppi di *E. coli*, che possono causare enteriti gravi soprattutto a poche settimane di vita (Jiang et al., 2019), supporta l'ipotesi che anche i cinghiali più giovani possano avere una maggiore suscettibilità a questa infezione. Inoltre, per gli animali domestici è stato messo in evidenza che i piccoli potrebbero avere una maggiore predisposizione per questi ceppi a causa di una microflora intestinale non ancora pienamente sviluppata che potrebbe essere maggiormente esposta a nuove colonizzazioni batteriche (Pereira et al., 2014). La differenza di prevalenza dei ceppi ESBL/AmpC e dei geni CTX-M e TEM riscontrate tra stagioni venatorie potrebbe essere riconducibile al ruolo di indicatore ambientale del cinghiale. Infatti, premesso che una

delle cause principali dell'insorgenza di resistenza è l'uso eccessivo di antibiotici (Capozzi et al., 2019) e considerando il noto ruolo di “conduttore” svolto dall'ambiente nella trasmissione di geni di resistenza e di ceppi patogeni (Graham et al., 2019), sembrerebbe che fino al 2017 l'ecosistema frequentato dai cinghiali fosse più contaminato da batteri resistenti rispetto agli anni successivi. In questo senso va tenuta in considerazione anche la caratteristica intrinseca della dieta del cinghiale ovvero di essere un onnivoro opportunista che può modificare anche drasticamente la sua alimentazione in base alla disponibilità di cibo. Tuttavia, con i dati al momento disponibili non risulta possibile trarre delle conclusioni robuste rispetto a queste variazioni di prevalenza, alla luce anche della sorprendente rapidità con cui si è verificato il cambiamento di trend tra stagioni venatorie.

Rispetto ai risultati emersi nei maiali, va osservato che, anche in questo caso, le prevalenze dei geni di resistenza confermano quanto già noto in letteratura, anche se nel presente studio sono stati riscontrati dei valori più alti rispetto a quelli delle indagini precedenti (Gao et al., 2015; Bergšpica et al., 2020). L'ipotesi principale è che le resistenze riscontrate possano essere ascrivibili all'eccessivo uso di antibiotici (EMA e EFSA, 2017), che spiegherebbe anche le differenze significative con le prevalenze riscontrate nel cinghiale. Tuttavia, lo studio ancora in fase preliminare non permette di trarre considerazioni e valutazioni concrete sui maiali anche rispetto alle potenziali differenze di prevalenza tra gli anni e le tipologie di allevamento.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha messo in evidenza la diffusione di *E. coli* ESBL/AmpC in suidi domestici e selvatici della provincia di Brescia. Rispetto ai cinghiali, sarebbe auspicabile la prosecuzione delle analisi al fine di creare serie storiche di dati per monitorare l'andamento temporale della diffusione dei ceppi e dei geni di AMR, idealmente affiancate da indagini atte a valutare il grado di contaminazione antimicrobica dell'ambiente. In questo senso, ulteriori analisi si rendono necessarie per selezionare all'interno dei comprensori di caccia gli allevamenti di suini, utilizzando come punto di partenza i risultati preliminari ottenuti sui maiali, e le zone di smaltimento dei liquami per pianificare un'ulteriore specifica raccolta di campioni di feci. In particolare, l'obiettivo sarebbe quello di valutare le prevalenze di *E. coli* ESBL/AmpC in territori condivisi con il cinghiale, con il fine ultimo di valutare se e quanto la presenza di questi ceppi negli animali domestici e nell'ambiente possa influenzarne la diffusione nella specie selvatica.

BIBLIOGRAFIA

1. Agersø Y., Aarestrup F.M. (2013) “Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs”. *J Antimicrob Chemother.* 68, 569-572.
2. Alonso C.A., González-Barrio D., Ruiz-Fons F., Ruiz-Ripa L., Torres C. (2017) “High frequency of B2 phylogroup among non-clonally related fecal *Escherichia coli* isolates from wild boars, including the lineage ST131”. *FEMS Microbiol Ecol.* 93, fix016.
3. Arlet G., Rouveau M., Philippon A. (1997) “Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β -lactamase”. *FEMS Microbiol Lett.* 152, 163-67.
4. Baldo V., Salogni C., Giovannini S., D'Incau M., Boniotti M.B., Birbes L., Pitozzi A., Formenti N., Grassi A., Pasquali P., Alborali G.L. (2020) “Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis”. *Front Vet Sci.* 7, 545818.
5. Bergšpica I, Kaprou G, Alexa EA, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A (2020) “Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the

- European Union”. *Antibiotics*. 9, 678.
6. Bonardi S., Cabassi C.S., Longhi S., Pia F., Corradi M., Gilioli S., Scaltriti E. (2019) “Detection of Extended- Spectrum Beta-Lactamase producing *Escherichia coli* from mesenteric lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*)”. *Ital J Food Saf.* 7.
 7. Capozzi C., Maurici M., Panà A. (2019) “Antimicrobial resistance: it is a global crisis, “a slow tsunami””. *Ig Sanita Pubbl.* 75, 429-450.
 8. Dahms C., Hubner N.O., Kossow A., Mellmann A., Dittmann K., Kramer A. (2015) “Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany”. *PLoS One*; 10, e0143326.
 9. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. (2010) Increased detection of extended-spectrum β -lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol.* 145, 273–8. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.019
 10. EMA (European Medicines Agency), EFSA (European Food Safety Authority). (2017) “EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA)”. [EMA/CVMP/570771/2015]. *EFSA J.* 15, 4666, 245 pp.
 11. Gao L., Tan Y., Zhang X., Hu J., Miao Z., Wei L., Chai T. (2015) “Emissions of *Escherichia coli* Carrying Extended-Spectrum β -Lactamase Resistance from Pig Farms to the Surrounding Environment”. *Int J Environ Res Public Health.* 12, 4203-4213.
 12. Graham D.W., Bergeron G., Bourassa M.W., Dickson J., Gomes F., Howe A., Kahn L.H., Morley P.S., Scott H. M., Simjee S., Singer R.S., Smith T.C., Storrs C., Wittum T.E. (2019) “Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems”. *Ann NY Acad Sci.* 1441, 17-30.
 13. Heuer H., Schmitt H., Smalla K. (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields *Curr Opin Microbiol.* 14, 236-243.
 14. Holtmann A.R., Meemken D., Müller A., Seinige D., Büttner K., Failing K., Kehrenberg C. (2021) “Wild Boars Carry Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC-Producing *Escherichia coli*”. *Microorganisms.* 9, 367
 15. Jiang F., Wu Z., Zheng Y., Frana T.S., Sahin O., Zhang Q., Li G. (2019) “Genotypes and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Hemolytic *Escherichia coli* from Diarrheic Piglets”. *Foodborne Pathog Dis.* 16.
 16. Literak I., Dolejska M., Radimersky T., Klimes J., Friedman M., Aarestrup F.M., Hasman H., Cizek A. (2010) “Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars”. *J Appl Microbiol.* 108, 1702-11.
 17. Mabilat C., Goussard S., Sougakoff W., Spencer R.C., Courvalin P (1990) “Direct sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extendedbroad-spectrum β -lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumonia*”. *Plasmid.* 23, 27-34.
 18. Pereira R., Siler V.V., J. D, Bicalho R. C., Warnick L. D. (2014) “In Vivo Selection of Resistant *E. coli* after ingestion of Milk with Added Drug Residues”. *PLoS ONE* 9, e115223.
 19. Plaza-Rodríguez C., Alt K., Grobbel M., Hammerl J.A., Irrgang A., Szabo I., Stingl K., Schuh E., Wiehle L., Pfefferkorn B., Naumann S., Kaesbohrer A., Tenhagen B.-A. (2021) “Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany?” *Front Vet Sci.* 7, 627821.
 20. Poeta P., Radhouani H., Pinto L., Martinho A., Rego V., Rodrigues R., Gonçalves A., Rodrigues J., Estepa V., Torres C., Igrejas G. (2009) “Wild boars as reservoirs of extended-

- spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups". J Basic Microbiol. 49, 584–588.
21. R Core Team. (2020) "R: A language and environment for statistical computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria,. URL <https://www.R-project.org/>
 22. Tinoco Torres R., Fernandes J., Carvalho J., Cunha M.V., Caetano T., Mendo S., Serrano E., Fonseca C. (2020) "Wild boar as a reservoir of antimicrobial resistance". Sci Total Environ. 717, 135001.
 23. Vale A.P., Cousins C., Tzora A., McCarron M.-T., Green A., Molloy S., Bainbridge J., Leonard F. (2020) "Molecular characterization of fecal *Escherichia coli* isolated from zoo animals". J Zoo Wildl Med. 50, 813-821.
 24. Van Damme I., Garcia-Graells C., Biasino W., Gowda T., Botteldoorn N., De Zutter L. (2017) "High abundance and diversity of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in faeces and tonsils of pigs at slaughter". Vet Microbiol. 208, 190-4.
 25. von Salviati C., Laube H., Guerra B., Roesler U., Friese A. (2015) "Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas". Vet Microbiol. 175, 77-84.
 26. Woodford N., Fagan E.J., Ellington M.J. (2006) "Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases". J Antimicrob Chemother. 57, 154-5.
 27. Wasyl D., Zajac M., Lalak A., Skarżyńska M., Samcik I., Kwit R., Jabłoński A., Bocian Ł., Woźniakowski G., Hoszowski A., Szulowski K. (2018) "Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals in Poland. Microb Drug Resist". 24, 807-815.
 28. Wu G., Day M.J., Mafura M.T., Nunez-Garcia J., Fenner J.J., Sharma M., van Essen-Zandbergen A., Rodríguez I., Dierikx C., Kadlec K., Schink A.-K., Wain J., Helmuth R., Guerra B., Schwarz S., Threlfall J., Woodward M.J., Woodford N., Coldham N., Mevius D. (2013) "Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and hu-mans from the UK. The Netherlands and Germany". PLoS ONE. 8, e75392.